UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos
Área de Bromatologia

Incorporação de antimicrobianos naturais em filme
biodegradável à base de alginato para o controle de
Listeria monocytogenes em embutido cárneo fatiado

Maria Crystina Igarashi

Tese para obtenção do Título de
DOUTOR

Orientador
Profa. Assoc. Mariza Landgraf

São Paulo
2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos
Área de Bromatologia

Incorporação de antimicrobianos naturais em filme
biodegradável à base de alginato para o controle de
Listeria monocytogenes em embutido cárneo fatiado

Maria Crystina Igarashi

Versão Corrigida

Tese para obtenção do Título de
DOUTOR

Orientador
Profa. Assoc. Mariza Landgraf

São Paulo
2015

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

I24i	<p>Igarashi, Maria Crystina</p> <p>Incorporação de antimicrobianos naturais em filme biodegradável à base de alginato para o controle de <i>Listeria monocytogenes</i> em embutido cárneo fatiado / Maria Crystina Igarashi. -- São Paulo, 2015.</p> <p>105p.</p> <p>Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental</p> <p>Orientador : Landgraf, Mariza</p> <p>1. Microbiologia de alimentos . 2. Alimentos : Preservação: Tecnologia I. T. II. Landgraf, Mariza, orientador.</p> <p style="text-align: right;">664.07 CDD</p>
------	--

Maria Crystina Igarashi

Incorporação de antimicrobianos naturais em filme
biodegradável à base de alginato para o controle de
Listeria monocytogenes em embutido cárneo fatiado

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do Título de Doutor

Profa. Assoc. Mariza Landgraf
orientador/presidente

Prof. Dr. Uelinton Manoel Pinto

Profa. Dra. Ivone Delazari

Profa. Dra. Elaine Cristina Pereira de Martinis

Prof. Dr. Paulo José do Amaral Sobral

São Paulo, 03 de Novembro de 2015.

AGRADECIMENTOS

À professora Mariza Landgraf, pela orientação e oportunidade de desenvolvimento deste trabalho, pelo carinho, pela confiança e por acreditar em mim.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP e ao Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental, pela oportunidade de desenvolver este trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pela concessão de bolsa de estudo.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pelo auxílio financeiro (2012/01726-1) recebido para a execução deste trabalho.

Às professoras Mariza Landgraf, Maria Teresa Destro e Bernadette D. G. M. Franco, com quem aprendi lições preciosas de Microbiologia de Alimentos e a quem devo grande parte dos conhecimentos científicos adquiridos ao longo desses anos.

Às professoras Maria Teresa Destro, Elaine C. P. de Martinis e Susana Saad pelas sugestões e críticas realizadas no Exame de Qualificação que auxiliaram no direcionamento desta pesquisa.

À professora Carmen Tadini, da Escola Politécnica – USP, pelas sugestões, pelo apoio no desenvolvimento deste trabalho e por disponibilizar a utilização de equipamentos do Laboratório de Engenharia de Alimentos.

À Otilia, Helena, e ao técnico Ivan, do Laboratório de Engenharia de Alimentos da POLI-USP, por toda ajuda durante os dias de análise.

À professora Inar Castro, do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental, pelas sugestões para a realização da análise sensorial.

À professora Úrsula, do departamento de Alimentos e Nutrição Experimental, pelo empréstimo de dessecadores.

À Rosângela, técnica do laboratório de Lípidos, pelo auxílio na análise de compostos fenólicos.

Ao Daniel Fernandes Zóia, da empresa Vogler, pela doação das amostras de alginato e pelo esclarecimento de dúvidas sempre que necessário.

Ao Everton Chaves, da empresa Duas Rodas, pela doação de óleos essenciais e pela cooperação à pesquisa acadêmica no reenvio de amostras sempre que solicitadas.

Ao Anderson, Isabela, Matheus e Patrícia, pelo incentivo, sugestões e amizade.

Aos colegas que ficam ou passaram pelo Laboratório de Microbiologia de Alimentos: Aline, Ana Carolina, Daniele Faria, Daniele Maffei, Erika, Fabiana, Isabela, Janaina, Natacha, Rafael, Raquel, Rita, Rubia, Svetoslav, Vanessa e Vinícius.

À Lúcia e Kátia, por toda ajuda no decorrer desta pesquisa.

À Mônica, Cleonice, Edílson e Roberta, da secretaria do departamento de Alimentos, pelos serviços prestados.

À secretaria de pós-graduação, pela atenção dedicada e serviços prestados.

Aos meus pais que sempre me apoiaram e me incentivaram em minhas escolhas.

Ao Marcos, amigo e companheiro, por sempre me apoiar em minhas decisões.

Aos meus familiares e amigos pelo incentivo.

E a todos que direta ou indiretamente colaboraram para a realização deste trabalho.

RESUMO

IGARASHI, M.C. **Incorporação de antimicrobianos naturais em filme biodegradável à base de alginato para o controle de *Listeria monocytogenes* em embutido cárneo fatiado**. 2015. 105f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

A incorporação de substâncias antimicrobianas, entre elas os óleos essenciais, em embalagens tem como objetivo minimizar a contaminação microbiana em alimentos. No entanto, essa utilização é limitada por critérios sensoriais, sendo necessário determinar a concentração mínima necessária para inibir o desenvolvimento de micro-organismos sem afetar sensorialmente as características do alimento. Assim, os objetivos dessa pesquisa foram: determinar a concentração inibitória mínima (CIM) de óleos essenciais (OE) para *Listeria monocytogenes* (LM); avaliar do efeito da combinação de óleos essenciais para a redução da população de LM; avaliar a combinação de compostos ativos presentes em óleos essenciais para a inibição de LM, *Pseudomonas* spp e *Salmonella* spp; avaliar *in vitro* e *in situ* a eficiência antimicrobiana do filme à base de alginato incorporado de compostos ativos presentes em óleos essenciais; determinar a disponibilidade dos compostos ativos incorporados ao filme pela determinação dos compostos fenólicos totais; caracterizar o filme frente às propriedades mecânicas e propriedades de barreira, e verificar a aceitação pelo consumidor, através da análise sensorial, de fatias de salame embaladas com o filme antimicrobiano. Constatou-se que a combinação de eugenol (0,01%) e limoneno (0,04%) apresentou um maior efeito para a redução da população de LM comparado ao uso individual desses compostos, confirmando, portanto, a existência de sinergismo entre esses dois compostos. Em relação à *Pseudomonas* spp, o sinergismo foi constatado quando as concentrações de eugenol (0,15%) e de limoneno (0,30%) foram utilizadas, no entanto, para *Salmonella* spp o mesmo efeito não foi observado. Em ensaios *in vitro* apesar do aumento na concentração de eugenol e limoneno incorporados à matriz do filme, não houve diferença significativa para os valores de zona de inibição antimicrobiana porém, em ensaios *in situ*, a utilização desse filme como embalagem primária promoveu a redução de 2 log UFC/g da população de LM até o 10º dia de análise permanecendo constante até o 30º dia o que não ocorreu com a combinação de eugenol (0,15%) e limoneno (0,3%). A quantificação dos compostos fenólicos totais nas amostras mostrou que há correlação entre o teor de compostos fenólicos extraídos da amostra do filme e o comportamento de LM. As propriedades mecânicas e de barreira do filme à base de alginato não foram significativamente afetadas pelas concentrações de eugenol e limoneno avaliadas neste estudo. O sabor, o aroma e a aparência das amostras de salame foram aceitos pelos provadores mostrando que o uso do filme à base de alginato incorporado com eugenol e limoneno é viável para a aplicação como embalagem antimicrobiana para o controle de *L. monocytogenes* em salame fatiado. Este resultado é considerado importante, pois em alimentos com atividade de água e valores de pH adequados à multiplicação desse patógeno e armazenados sob refrigeração, a temperatura é capaz de selecionar a microbiota presente no alimento, favorecendo a multiplicação de micro-organismos psicrófilos, como *L. monocytogenes*.

Palavras-chave: Filmes à base de alginato. Óleos essenciais. Eugenol. Limoneno. *Listeria monocytogenes*. *Pseudomonas* spp. *Salmonella* spp.

ABSTRACT

IGARASHI, M.C. **Incorporation of natural antimicrobials into alginate based film for the control of *Listeria monocytogenes* in sliced meat product.** 2015. 105f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

The incorporation of antimicrobial substances in packages aims at reducing food microbial contamination among which the phenolic compounds extract from plants have received special attention being natural and attending consumer demand. However, the use of these compounds is limited by sensory criteria and it is necessary to determine the minimum concentration required to inhibit the growth of microorganisms without affecting the sensory characteristics of the food. The aim of this research were: to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) of essential oils (EO) for *Listeria monocytogenes* (LM); to evaluate effect of the combination of essential oils in order to reduce LM population; to evaluate the active compounds combination for the inhibition of LM, *Pseudomonas* spp, and *Salmonella* spp; to evaluate the antimicrobial efficiency *in vitro* and *in situ* of the alginate film incorporated with the active compounds; to determine the availability of the active compounds incorporated into the film for the determination of total phenolic compounds; to characterize the mechanical and barrier properties of the film, and to verify consumer acceptance of slices of salami packaged with the antimicrobial film. The combination of eugenol (0.01%) and limonene (0.04%) showed a greater effect for reducing LM population compared to the individual use of these compounds, confirming the existence of synergism between these two compounds. Regarding *Pseudomonas* spp, synergism was observed when the concentrations of eugenol (0.15%) and limonene (0.30%) were used, however, the same effect was not observed for *Salmonella* spp. In *in vitro* tests, despite of the increase in the concentration of limonene and eugenol incorporated in the film matrix, no significant difference for the antimicrobial inhibition zone values was observed. In *in situ* tests, the film containing eugenol (0.3%) and limonene (0.6%) promoted the reduction of 2 log CFU/g of LM population in sliced salami, while the combination of eugenol (0.15%) and limonene (0.3%) did not have the same effect. The quantification of the phenolic compounds in the film samples showed that there is correlation between the content of phenolic compounds extracted from the film sample and LM behavior. The mechanical properties of the barrier film and the alginate were not significantly affected by eugenol, and limonene concentrations evaluated in this study. The taste, flavor and appearance of the salami samples were accepted by the panel showing that the use of the alginate-based film incorporated with limonene and eugenol are feasible for use as antimicrobial packaging for the control of *L. monocytogenes* in sliced salami. This is an important result, because in food matrix with water activity and pH suitable for the pathogen growth, the storage under refrigerated condition is able to select the psychrophilic microorganisms, such as *L. monocytogenes*.

Key words: Alginate film. Essential oils. Eugenol. Limonene. *Listeria monocytogenes*. *Pseudomonas* spp. *Salmonella* spp.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	1
2	OBJETIVOS	12
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	13
3.1	MATERIAL	13
3.1.1	MICRO-ORGANISMOS UTILIZADOS	13
3.1.1.1	<i>Listeria monocytogenes</i>	13
3.1.1.1.1	<i>Pseudomonas spp</i> e <i>Salmonella spp</i>	13
3.1.2	ÓLEOS ESSENCIAIS	13
3.1.3	COMPOSTOS ATIVOS.....	14
3.1.4	MATÉRIAS-PRIMAS UTILIZADAS NO DESENVOLVIMENTO DOS FILMES À BASE DE ALGINATO	14
3.2	MÉTODOS	14
3.2.1	DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA DE ÓLEOS ESSENCIAIS	14
3.2.1.1	Preparo da emulsão	14
3.2.1.2	Método da diluição em caldo	14
3.2.2	ELABORAÇÃO DOS FILMES À BASE DE ALGINATO	15
3.2.3	AVALIAÇÃO DO EFEITO DA COMBINAÇÃO DE OE SOBRE A REDUÇÃO DA POPULAÇÃO DE <i>L. MONOCYTOGENES</i>	16
3.2.4	AVALIAÇÃO DO SINERGISMO DOS COMPOSTOS ATIVOS PRESENTES NO OE DE CRAVO E OE DE LIMÃO SOBRE A REDUÇÃO DA POPULAÇÃO DE <i>L. MONOCYTOGENES</i> ..	18
3.2.5	AVALIAÇÃO DO SINERGISMO DOS COMPOSTOS ATIVOS PRESENTES NO OE DE CRAVO E OE DE LIMÃO SOBRE A REDUÇÃO DA POPULAÇÃO DE <i>PSEUDOMONAS SPP</i> E <i>SALMONELLA SPP</i>	19
3.2.6	ANÁLISES DE CARACTERIZAÇÃO DO FILME ANTIMICROBIANO À BASE DE ALGINATO	20
3.2.6.1	Atividade antimicrobiana <i>in vitro</i> dos filmes	20
3.2.6.2	Propriedades mecânicas	20
3.2.6.3	Propriedades de barreira	22
3.2.6.3.1	Permeabilidade ao vapor de água	22
3.2.6.3.2	Permeabilidade ao oxigênio	23
3.2.6.4	Atividade de água.....	25
3.2.6.5	Avaliação da disponibilidade dos compostos ativos incorporados ao filme de alginato ..	25
3.2.7	ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS FILMES EM SALAME FATIADO	25
3.2.7.1	Preparo do inóculo de <i>Listeria monocytogenes</i>	26
3.2.7.2	Atividade antimicrobiana dos filmes contra <i>L. monocytogenes</i> em salame fatiado	26

3.2.7.3	Análises microbiológicas.....	28
3.2.7.3.1	Preparo das amostras para a enumeração do micro-organismo.....	28
3.2.7.3.2	Pesquisa de <i>L. monocytogenes</i>	28
3.2.7.3.3	Enumeração de <i>L. monocytogenes</i>	29
3.2.8	ANÁLISE SENSORIAL.....	29
3.2.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA	30
4	RESULTADOS	32
4.1	DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA DE ÓLEOS ESSENCIAIS	32
4.2	AVALIAÇÃO DO SINERGISMO DE OE	34
4.3	AVALIAÇÃO DO SINERGISMO DOS COMPOSTOS ATIVOS PRESENTES NO OE DE CRAVO E OE DE LIMÃO CONTRA <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i>	38
4.4	AVALIAÇÃO DO SINERGISMO DOS COMPOSTOS ATIVOS PRESENTES NO OE DE CRAVO E OE DE LIMÃO CONTRA <i>PSEUDOMONAS SPP</i> E <i>SALMONELLA SPP</i>	43
4.4.1	CARACTERIZAÇÃO DO FILME ANTIMICROBIANO À BASE DE ALGINATO	48
4.4.1.1	Atividade antimicrobiana <i>in vitro</i> dos filmes contra <i>Listeria monocytogenes</i> e <i>Pseudomonas spp</i>	48
4.4.1.2	Propriedades Mecânicas	55
4.4.1.3	Propriedades de Barreira	56
4.4.1.4	Atividade de água.....	57
4.4.1.5	Avaliação da disponibilidade dos compostos ativos incorporados no filme de alginato ..	58
4.4.2	ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS FILMES EM CONTATO COM SALAME FATIADO	60
4.4.3	ANÁLISE SENSORIAL.....	65
5	CONCLUSÃO	68
6	REFERÊNCIAS	69
7	ANEXO A	83
8	ANEXO B	104
9	ANEXO C	105

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática do processo de elaboração dos filmes conforme descrito por Igarashi, 2010.....	16
Figura 2. Amostra de salame contaminado experimentalmente com <i>Listeria monocytogenes</i> , coberto com o filme antimicrobiano e embalado à vácuo	27
Figura 3. Apresentação das amostras de salame para o teste de aceitação	30
Figura 4. Curvas de contorno para a variável resposta população de <i>L. monocytogenes</i> (log UFC/mL) (A) <i>L. monocytogenes</i> Scott A, (B) <i>L. monocytogenes</i> ATCC, (C) <i>L. monocytogenes</i> 1/2c, (D) <i>L. monocytogenes</i> 1/2a, (E) <i>L. monocytogenes</i> 4b e (F) <i>L. monocytogenes</i> f em função da concentração de Eugenol (%) e Limoneno (%)	42
Figura 5. Curvas de contorno para a variável resposta população de <i>Pseudomonas</i> spp (log UFC/mL) (A) <i>P. fluorescens</i> , (B) <i>P. putida</i> e (C) <i>P. aeruginosa</i> em função da concentração de Eugenol (%) e Limoneno (%)	47
Figura 6. Zona de inibição antimicrobiana para o ensaio contendo 0,04% de eugenol e 0,16% de limoneno	51
Figura 7. Zona de inibição antimicrobiana (mm ²) contra <i>Listeria monocytogenes</i> para os ensaios contendo a combinação de 0,04% eugenol e 0,16% limoneno, ensaio contendo 0,1% eugenol e ensaio contendo 0,4% limoneno	52
Figura 8. Zona de inibição antimicrobiana (mm ²) contra <i>Listeria monocytogenes</i> para os ensaios contendo a combinação de 0,04% eugenol e 0,16% limoneno, ensaio contendo 0,1% eugenol e ensaio contendo 0,4% imoneno.....	54
Figura 9. Comportamento de <i>L. monocytogenes</i> (log UFC.g ⁻¹) em salame fatiado coberto com o filme antimicrobiano contendo (—●—) 0,15% eugenol e 0,3% limoneno, (—●—) 0,3% eugenol e 0,6% limoneno e (—●—) sem o filme – controle - após 0, 10, 20 e 30 dias de armazenamento a 7°C.	61
Figura 10. Comparação entre o teor de fenólicos totais expressos em mg.L ⁻¹ ác. gálico equivalente e o comportamento de <i>L. monocytogenes</i> (log UFC.g ⁻¹) em salame fatiado coberto com o filme antimicrobiano contendo (a) 0,15% eugenol e 0,3% limoneno, e (b) 0,3% eugenol e 0,6% limoneno ao longo do período de armazenamento a 7°C	63
Figura 11. Aceitabilidade das amostras de salame fatiado com relação ao sabor e aroma.	65
Figura 12. Aceitabilidade das amostras de salame fatiado com relação à aparência.....	67
Figura 13. Valores experimentais versus valores previstos pelo modelo para a resposta população de <i>L. monocytogenes</i> Scott A (log UFC/mL)	84
Figura 14. Valores experimentais versus valores previstos pelo modelo para a resposta população de <i>L. monocytogenes</i> ATCC (log UFC/mL)	86
Figura 15. Valores experimentais versus valores previstos pelo modelo para a resposta população de <i>L. monocytogenes</i> 1/2c (log UFC/mL)	88
Figura 16. Valores experimentais versus valores previstos pelo modelo para a resposta população de <i>L. monocytogenes</i> 1/2a (log UFC/mL)	90
Figura 17. Valores experimentais versus valores previstos pelo modelo para a resposta população de <i>L. monocytogenes</i> 4b (log UFC/mL)	92
Figura 18. Valores experimentais versus valores previstos pelo modelo para a resposta população de <i>L. monocytogenes</i> f (log UFC/mL)	94

Figura 19. Valores experimentais versus valores previstos pelo modelo para a resposta população de <i>Pseudomonas fluorescens</i> (log UFC/mL)	96
Figura 20. Valores experimentais versus valores previstos pelo modelo para a resposta população de <i>Pseudomonas putida</i> (log UFC/mL)	98
Figura 21. Valores experimentais versus valores previstos pelo modelo para a resposta população de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (log UFC/mL)	100

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Surtos de listeriose relacionanados ao consumo de produtos cárneos prontos para o consumo entre os anos de 2000 a 2012.....	8
Tabela 2. Ocorrência de <i>Listeria monocytogenes</i> em produtos cárneos prontos para o consumo entre os anos de 2004 a 2015.....	10
Tabela 3. Valores codificados e valores originais (%) para as variáveis avaliadas no Delineamento Fatorial Fracionário 2^{4-1} com três pontos centrais.....	17
Tabela 4. Valores codificados e valores originais utilizados no Delineamento Central Composto Rotacional DCCR 2^2	18
Tabela 5. Valores codificados e valores originais utilizados no Delineamento Central Composto Rotacional DCCR 2^2	19
Tabela 6. Concentração inibitória mínima (CIM) de óleos essenciais para <i>Listeria monocytogenes</i> Scott A (Lm Scott A), <i>L. monocytogenes</i> ATCC 35152 (Lm ATCC 35152), <i>L. monocytogenes</i> sorovar 1/2c (Lm 1/2c), <i>L. monocytogenes</i> sorovar 1/2a (Lm 1/2a), <i>L. monocytogenes</i> sorovar 4b (Lm 4b) e <i>L. monocytogens</i> isolado de carcaça de frango (Lm f)	33
Tabela 7. População de <i>L. monocytogenes</i> (log UFC/mL) obtida a partir das combinações definidas pelo Delineamento Fatorial Fracionário 2^{4-1}	35
Tabela 8. Estimativa dos efeitos dos fatores OE de alho, OE de cravo, OE de limão e OE de menta para resposta da população de <i>L. monocytogenes</i> Scott A (log UFC/mL).....	35
Tabela 9. Estimativa dos efeitos dos fatores OE de alho, OE de cravo, OE de limão e OE de menta para resposta população de <i>L. monocytogenes</i> ATCC 35152 (log UFC/mL).....	35
Tabela 10. Estimativa dos efeitos dos fatores OE de alho, OE de cravo, OE de limão e OE de menta para resposta população de <i>L. monocytogenes</i> 1/2c (log UFC/mL)	36
Tabela 11. Estimativa dos efeitos dos fatores OE de alho, OE de cravo, OE de limão e OE de menta para resposta população de <i>L. monocytogenes</i> 1/2a (UFC/mL)	36
Tabela 12. Estimativa dos efeitos dos fatores OE de alho, OE de cravo, OE de limão e OE de menta para resposta população de <i>L. monocytogenes</i> 4b (log UFC/mL).....	36
Tabela 13. Estimativa dos efeitos dos fatores OE de alho, OE de cravo, OE de limão e OE de menta para resposta população de <i>L. monocytogenes</i> f (log UFC/mL)	36
Tabela 14. Exemplos da avaliação de sinergismo entre óleos essenciais (OE) e outros antimicrobianos em ensaios realizados <i>in vitro</i>	38
Tabela 15. Concentração inibitória mínima (CIM) de eugenol e limoneno para <i>Listeria monocytogenes</i> Scott A (Lm Scott A), <i>L. monocytogenes</i> ATCC 35152 (Lm ATCC 35152), <i>L. monocytogenes</i> sorovar 1/2c (Lm 1/2c), <i>L. monocytogenes</i> sorovar 1/2a (Lm 1/2a), <i>L. monocytogenes</i> sorovar 4b (Lm 4b) e <i>L. monocytogens</i> isolado de carcaça de frango (Lm f)	39
Tabela 16. População de <i>L. monocytogenes</i> (log UFC/mL) obtida a partir das combinações definidas pelo Delineamento Composto Central Rotacional 2^2	40
Tabela 17. Modelo final para a população (P) de <i>Listeria monocytogenes</i> avaliado em função da concentração de eugenol (E) e limoneno (L) adicionada na formulação do filme de alginato	40
Tabela 18. Concentração inibitória mínima (CIM) de eugenol e limoneno para <i>Pseudomonas fluorescens</i> , <i>Pseudomonas putida</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Salmonella</i> Give e <i>Salmonella</i> Enteritidis	43

Tabela 19. População de <i>Pseudomonas</i> spp (log UFC/mL) obtida a partir das combinações definidas pelo Delineamento Composto Central Rotacional 2 ²	45
Tabela 20. População de <i>Salmonella</i> spp (log UFC/mL) obtida a partir das combinações definidas pelo Delineamento Composto Central Rotacional 2 ²	45
Tabela 21. Modelo final para a população (P) de <i>Pseudomonas</i> spp avaliado em função da concentração de eugenol (E) e limoneno (L) adicionada na formulação do filme de alginato	46
Tabela 22. Atividade antimicrobiana dos filmes avaliada pela medida da zona de inibição em mm ² para as etapas antes (I) e após o <i>crosslinking</i> complementar com cloreto de cálcio (II) referente aos ensaios contendo a combinação de eugenol a 0,04% e limoneno 0,16%, ensaio contendo eugenol a 0,1% e ensaio contendo limoneno a 0,4%.	50
Tabela 23. Atividade antimicrobiana dos filmes contra <i>Pseudomonas fluorescens</i> (Pf), <i>P. putida</i> (Pp) e <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 (PaATCC) avaliada pela medida da zona de inibição em mm ² referente aos ensaios contendo a combinação de 0,15% eugenol e 0,30% limoneno e 0,30% eugenol e 0,60% limoneno	53
Tabela 24. Atividade antimicrobiana dos filmes contra <i>Listeria monocytogenes</i> Scott A (Lm Scott A), <i>L. monocytogenes</i> ATCC 35152 (Lm ATCC35152), <i>L. monocytogenes</i> sorovar 1/2c (Lm 1/2c), <i>L. monocytogenes</i> sorovar 1/2a (Lm 1/2a), <i>L. monocytogenes</i> sorovar 4b (Lm 4b) e <i>L. monocytogenes</i> isolado de carcaça de frango (Lm f) avaliada pela medida da zona de inibição em mm ² referente aos ensaios contendo a combinação de 0,15% eugenol e 0,30% limoneno e 0,30% eugenol e 0,60% limoneno.....	53
Tabela 25. Valores de resistência máxima à tração (R _{máx}) e alongamento na ruptura (%) referente aos ensaios contendo a combinação de 0,04% eugenol e 0,16% limoneno, 0,15% eugenol e 0,3% limoneno e ensaio contendo 0,30% eugenol e 0,60% limoneno adicionados à formulação do filme à base de alginato	55
Tabela 26. Valores de permeabilidade ao vapor de água referente aos ensaios contendo a combinação de 0,04% eugenol e 0,16% limoneno, 0,15% eugenol e 0,3% limoneno e ensaio contendo 0,30% eugenol e 0,60% limoneno adicionados à formulação do filme à base de alginato	56
Tabela 27. Coeficiente de permeabilidade ao oxigênio (P'O ₂) dos filmes à base de alginato contendo a combinação de 0,04% eugenol e 0,16% limoneno, 0,15% eugenol e 0,3% limoneno e ensaio contendo 0,30% eugenol e 0,60% limoneno	57
Tabela 28. Concentração dos compostos fenólicos totais presentes no filme à base de alginato incorporados com eugenol e limoneno analisados em diferentes períodos de armazenamento	59
Tabela 29. Coeficientes da regressão para a variável resposta população de <i>L. monocytogenes</i> Scott A (log UFC/mL).....	84
Tabela 30. ANOVA para a variável resposta população de <i>L. monocytogenes</i> Scott A (log UFC/mL).....	84
Tabela 31. Valores experimentais, previstos pelo modelo, desvios e desvio relativo....	85
Tabela 32. Coeficientes da regressão para a variável resposta população de <i>L. monocytogenes</i> ATCC 35152 (log UFC/mL)	86
Tabela 33. ANOVA para a variável resposta população de <i>L. monocytogenes</i> ATCC 35152 (log UFC/mL).....	86
Tabela 34. Valores experimentais, previstos pelo modelo, desvios e desvio relativo....	87
Tabela 35. Coeficientes da regressão para a variável resposta população de <i>L. monocytogenes</i> 1/2c (log UFC/mL).....	88

Tabela 36. ANOVA para a variável resposta população de <i>L. monocytogenes</i> 1/2c (log UFC/mL)	88
Tabela 37. Valores experimentais, previstos pelo modelo, desvios e desvio relativo ...	89
Tabela 38. Coeficientes da regressão para a variável resposta população de <i>L. monocytogenes</i> 1/2a (log UFC/mL)	90
Tabela 39. ANOVA para a variável resposta população de <i>L. monocytogenes</i> 1/2a (log UFC/mL)	90
Tabela 40. Valores experimentais, previstos pelo modelo, desvios e desvio relativo ...	91
Tabela 41. Coeficientes da regressão para a variável resposta população de <i>L. monocytogenes</i> 4b (log UFC/mL)	92
Tabela 42. ANOVA para a variável resposta população de <i>L. monocytogenes</i> 4b (log UFC/mL)	92
Tabela 43. Valores experimentais, previstos pelo modelo, desvios e desvio relativo ...	93
Tabela 44. Coeficientes da regressão para a variável resposta população de <i>L. monocytogenes</i> f (log UFC/mL)	94
Tabela 45. ANOVA para a variável resposta população de <i>L. monocytogenes</i> f (log UFC/mL)	94
Tabela 46. Valores experimentais, previstos pelo modelo, desvios e desvio relativo ...	95
Tabela 47. Coeficientes da regressão para a variável resposta população de <i>Pseudomonas fluorescens</i> (log UFC/mL)	96
Tabela 48. ANOVA para a variável resposta população de <i>Pseudomonas fluorescens</i> (log UFC/mL)	96
Tabela 49. Valores experimentais, previstos pelo modelo, desvios e desvio relativo ...	97
Tabela 50. Coeficientes da regressão para a variável resposta população de <i>Pseudomonas putida</i> (log UFC/mL)	98
Tabela 51. ANOVA para a variável resposta população de <i>Pseudomonas putida</i> (log UFC/mL)	98
Tabela 52. Valores experimentais, previstos pelo modelo, desvios e desvio relativo ...	99
Tabela 53. Coeficientes da regressão para a variável resposta população de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (log UFC/mL)	100
Tabela 54. ANOVA para a variável resposta população de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (log UFC/mL)	100
Tabela 55. Valores experimentais, previstos pelo modelo, desvios e desvio relativo ..	101
Tabela 56. Coeficientes da regressão para a variável resposta população de <i>Salmonella GIVE</i> (log UFC/mL)	102
Tabela 57. ANOVA para a variável resposta população de <i>Salmonella GIVE</i> (log UFC/mL)	102
Tabela 58. Coeficientes da regressão para a variável resposta população de <i>Salmonella Enteritidis</i> (log UFC/mL)	103
Tabela 59. ANOVA para a variável resposta população de <i>Salmonella Enteritidis</i> (log UFC/mL)	103

1 INTRODUÇÃO

Os polímeros sintéticos representam cerca de 25% de todo material utilizado na indústria de embalagem e são considerados o maior grupo de resíduos poluentes depositados no meio ambiente. Este tipo de embalagem destaca-se por apresentar propriedades mecânicas e de barreira superiores aos encontrados em outros materiais de embalagem (JAYASEKARA *et al.*, 2005).

A Food and Drug Administration (FDA) dos Estados Unidos destaca que, em muitos casos, não é possível a utilização de materiais reciclados na fabricação de novas embalagens para alimentos, uma vez que componentes químicos e aditivos remanescentes do processo de reciclagem podem migrar e afetar a inocuidade desse alimento. A dificuldade na eliminação de aditivos e coadjuvantes durante o processo de reciclagem deve-se ao fato deles serem incorporados à matriz polimérica durante a fabricação da embalagem (FDA, 2006).

A substituição de embalagens sintéticas por embalagens biodegradáveis, tais como os filmes e coberturas comestíveis, apresenta-se como alternativa ao uso de recursos não-renováveis como material de embalagem. Inúmeras matrizes vêm sendo utilizadas e suas propriedades variam com o tipo de base utilizada podendo ser divididas em três categorias segundo sua composição: polissacarídicas e seus derivados, proteicas e lipídicas (BRAVIN, PERESSINI e SENSIDONI, 2006).

A comercialização desse tipo de material é limitado pelas propriedades mecânicas e de barreira inferiores aos polímeros sintéticos (AZEREDO *et al.*, 2009), porém, estudos vêm sendo realizados com o objetivo de melhorar essas propriedades pela adição de nanocompósitos e assim viabilizar sua comercialização (FALGUERA *et al.*, 2011; SORRENTINO *et al.*, 2007). A adição de nanocompósitos a filmes e coberturas comestíveis deve ser acompanhada de testes toxicológicos, pois devido ao tamanho de sua estrutura, os nanomateriais podem penetrar nas células e eventualmente permanecer no organismo humano (FALGUERA *et al.*, 2011).

Com o aumento da demanda do mercado consumidor por alimentos em porções individualizadas, a expectativa para o uso de filmes e coberturas comestíveis tende a crescer, principalmente, quando estes são utilizados como embalagem primária (FALGUERA *et al.*, 2011). Além disso, nos Estados Unidos, a US Environmental Protection Agency (USEPA) destaca a importância da utilização de embalagens denominadas “green-packaging” para que o impacto na geração de resíduos seja reduzido.

Entre os diversos ingredientes usados em filmes e coberturas comestíveis encontra-se o alginato que é um polissacarídeo extraído de algas marinhas pardas da classe *Phaeophyceae* (GACESA, 1988). Por serem naturais e considerados seguros, os sais de alginato são amplamente utilizados na indústria de alimentos como espessante, estabilizante e na produção de filmes e coberturas para uso em alimentos (ROJAS-GRAÜ *et al.*, 2007a).

O alginato é um co-polímero formado por blocos de β -1,4-D-manurônico (M) e α -1,4-L-gulurônico (G) (ERTESVAG e VALLA, 1998; GACESA, 1988). Todos os blocos são polianiónicos e formam ligações iônicas intermoleculares na presença de cátions di ou multivalentes, como o Ca^{2+} , por exemplo. Entretanto, as regiões onde há predomínio de blocos-G são as que quelam os íons metálicos mais facilmente devido ao arranjo espacial da molécula que torna essa interação mais forte (GACESA, 1988). Segmentos de cadeia consistindo de resíduos de ácido manurônico e gulurônico alternados não interagem com o cálcio, mas servem para unir as estruturas agregadas, produzindo uma rede tridimensional (CI *et al.*, 1999). Esta interação é responsável por uma das principais propriedades dos alginatos que é a formação de géis insolúveis (BRACCINI e PÉREZ, 2001; GACESA, 1988; GRANT *et al.*, 1973).

A razão entre as unidades M:G e a quantidade relativa dos três segmentos poliméricos varia com a fonte de obtenção. Assim, os alginatos extraídos de diferentes algas marinhas apresentam composição e estrutura polimérica diferentes e, conseqüentemente, apresentam propriedades diferentes. Uma diferença importante é observada na característica dos géis. Os alginatos com maior porcentagem de blocos-G formam géis mais rígidos, porém quebradiços. Já os géis de alginato com maior porcentagem de blocos-M são menos rígidos e apresentam maior flexibilidade (ERTESVAG e VALLA, 1998; GACESA, 1988).

Segundo Cha e Chinan (2004), os íons de cálcio são considerados os mais efetivos no processo de gelificação dos filmes à base de alginato, quando comparados com os íons de magnésio, manganês, alumínio e ferro. Pavlath *et al.* (1999) demonstraram que o tratamento por imersão em solução de cloreto de cálcio e cloreto de zinco foram os mais efetivos na formação de um filme insolúvel e de maior resistência mecânica quando comparado com os tratamentos utilizando íons de ferro, cobre, magnésio e alumínio.

De acordo com Kester e Fennema (1986), o processo de gelificação do alginato de sódio com cálcio pode ocorrer a partir da interação do cálcio ionizado com os polímeros de ácido algínico. A liberação de íons bivalentes de cálcio pode ser controlada pela alteração do pH e temperatura do meio. A segunda forma envolve a difusão de íons de cálcio para o interior da solução de alginato, onde o processo de gelificação é alcançado quando os íons de cálcio difundem-se através da interface gel-membrana.

Em relação a outras matrizes utilizadas no desenvolvimento de filmes biodegradáveis, a estrutura de filmes à base de alginato destaca-se por não sofrer alterações devido ao alto teor de umidade de certos alimentos (ROJAS-GRAÜ *et al.*, 2007a).

Os filmes e coberturas comestíveis podem apresentar a função de embalagens ativas como, por exemplo, as embalagens antimicrobianas. As embalagens com ação antimicrobiana vêm sendo estudadas com o objetivo de reduzir o risco do desenvolvimento de micro-organismos patogênicos e aumentar a vida-de-prateleira de produtos alimentícios (SUPPAKUL *et al.*, 2003). Inúmeros estudos relacionados à aplicação de coberturas antimicrobianas à base de alginato (DATTA *et al.*, 2008; LU *et al.*, 2009; OLIVAS, MATTINSON e BARBOSA-CÁNOVAS, 2007; RAYUBAUDI-MASSILIA *et al.* 2008) e filmes antimicrobianos à base de alginato (CHA *et al.*, 2002; MAIZURA *et al.*, 2007; MILLETTE *et al.*, 2007; OUSSALAH *et al.*, 2006a) já foram reportados na literatura.

Entre as substâncias antimicrobianas que podem ser adicionadas à composição de filmes biodegradáveis estão os óleos essenciais (OE) extraídos de plantas. Além de minimizar a contaminação microbiana de alimentos, os OE são considerados substâncias naturais, o que torna o seu uso extremamente atraente

pelo consumidor. A atividade antimicrobiana de OE é assegurada principalmente pela presença de compostos fenólicos e terpenos (OUSSALAH *et al.*, 2007a).

Até 2004, pouco se sabia sobre o modo de ação dos OE (Burt, 2004). Para Sikkema, de Bont e Poolman (1994), a interação entre as substâncias hidrofóbicas presentes em OE e os compostos lipídicos da membrana celular poderia propiciar uma alteração em sua estrutura e alterar sua permeabilidade causando o efluxo de íons e/ou saída de metabólitos celulares. Pesquisas realizadas nos últimos 10 anos por Devi *et al.* (2010) e Gill e Holley (2006) confirmam essas observações, ou seja, que eles agem na membrana celular alterando a sua permeabilidade e até mesmo rompendo-a.

Segundo Seydim e Sarikus (2006), os OE que possuem propriedades antimicrobianas para micro-organismos patogênicos contêm elevadas concentrações de compostos fenólicos como o carvacrol, o eugenol e o timol. Outros compostos ativos como o p-cimeno, aldeído cinâmico, terpineno, limoneno, alicina, dentre outros, são responsáveis pela ação antimicrobiana desses óleos (CEYLAN e FUNG, 2004). Além disso, estudos mostram que a combinação de diferentes compostos ativos pode promover um efeito sinérgico que potencializa a ação desses compostos contra diferentes tipos de micro-organismos (RATTANACHAIKUNSOPON e PHUMKHACKORN, 2009; VALERO e FRANCÉS, 2006; ZHOU *et al.*, 2007).

Considerado seguro para o consumo humano (GRAS–Generally Recognized as Safe), o uso de OE é limitado por critérios sensoriais. Por esta razão, é necessário determinar a concentração mínima necessária para inibir o crescimento de micro-organismos sem afetar sensorialmente as características do alimento (OUSSALAH *et al.*, 2007).

A metodologia empregada para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de OE e outros antimicrobianos naturais, é comumente adaptada do protocolo utilizado para a realização de antibiogramas. Observa-se em alguns trabalhos a adição de agentes tensoativos como, por exemplo, Tween 80 (polioxietileno (20) monooleato de sorbitana) e Tween 20 (polioxietileno monolaurático) ao meio de cultura como forma de garantir a estabilização do OE e assim permitir o contato entre o agente antimicrobiano e o micro-organismo

alvo durante a realização do experimento (CHAND *et al.*, 1994; HAMMER, CARSON e RILEY, 1999; FISHER e PHILIPS, 2006). No entanto, Schmolka (1973) *apud* Mann e Markham (1998), relata que os agentes surfactantes não-iônicos, como o Tween 80 e o Tween 20, utilizado em estudo envolvendo antibióticos, podem alterar algumas propriedades físico-químicas de OE, diminuindo sua ação antimicrobiana.

Como alternativa ao uso de agentes surfactantes não-iônicos, estão os emulsificantes utilizados no preparo de emulsões envolvendo aromas e óleos essenciais como, por exemplo, o amido modificado. A utilização de uma emulsão de OE em 10% de amido modificado (Purity gum Be) suspenso em água foi utilizada por Oussalah *et al.* (2006b), Oussalah *et al.* (2007a) e Turgis *et al.* (2009) em trabalhos envolvendo a avaliação de diferentes óleos essenciais contra bactérias patogênicas e deteriorantes. O amido modificado Purity gum Be, derivado de milho ceroso, apresenta modificações químicas que o tornam capaz de atuar como estabilizante no preparo de emulsões sem alterar a viscosidade do produto. Devido à capacidade de solubilizar-se em água fria e não perder a estabilidade após passar por algum tratamento térmico, este produto atua de forma semelhante à goma arábica, sendo esta, solubilizada a quente. O Purity gum Be é comumente utilizado por indústrias de bebidas carbonatadas no preparo de emulsões com óleos essenciais (NATIONAL STARCH FOOD INNOVATION, 2009).

A incorporação de OE e outros antimicrobianos naturais em formulação de filmes comestíveis foi objeto de estudo de inúmeros trabalhos, sendo a avaliação da atividade antimicrobiana *in vitro*, através da medida da zona de inibição em mm², a metodologia adotada pelos autores (BEVERLYA *et al.*, 2008; CHA *et al.*, 2002; DU *et al.*, 2008; MAIZURA *et al.*, 2007; PRANOTO, SALOKHE e RAKSHIT, 2005; SEBTI *et al.*, 2007; SEYDIM e SARIKUS, 2006; THEIVENDRAN, HETTIARACHCHY e JOHNSON, 2006).

Apesar da medida da zona de inibição antimicrobiana fornecer um indicativo da eficiência antimicrobiana do composto estudado, é necessário que estes resultados sejam validados em ensaios *in situ* para verificar a influência da interação do antimicrobiano com a matriz do alimento. Nesses ensaios *in situ*,

normalmente são utilizadas concentrações de OE acima da CIM (BURT, 2004; FISHER e PHILLIPS, 2008).

Em estudo realizado por Igarashi (2010), embora a adição de 0,8% OE de cravo em formulação de filme à base de alginato apresentasse eficácia comprovada para *Pseudomonas* spp, *Salmonella* spp e *L. monocytogenes*, em estudos realizados *in vitro*, esse efeito não foi constatado *in situ* quando utilizou carne de frango *in natura* como alimento modelo.

Apesar de não se mostrar efetivo no controle de *Salmonella* spp. e *Pseudomonas* spp, a utilização de filme à base de alginato adicionado de OE de cravo promoveu o controle na multiplicação de *L. monocytogenes* em amostras de carne de frango, uma vez que a amostra controle apresentou um aumento significativo de 1,34 log UFC/g na população do micro-organismo enquanto na amostra com cobertura de filme antimicrobiano a população manteve-se constante (IGARASHI, 2010). Este resultado é considerado importante, pois em alimentos com atividade de água e valores de pH adequados à multiplicação desse patógeno e armazenados sob refrigeração, a temperatura é capaz de selecionar a microbiota presente no alimento, favorecendo a multiplicação de micro-organismos psicotróficos, como *L. monocytogenes* (FARBER e PETERKIN, 1991).

Dentre todas as espécies pertencentes ao gênero *Listeria*, *L. monocytogenes* é considerada a de maior importância para a microbiologia de alimentos por ser patogênica ao homem. Segundo Sauders *et al.* (2006), os sorotipos 1/2a, 1/2b e 4b representam cerca de 95% dos isolados de listeriose humana.

A listeriose acomete principalmente indivíduos imunocomprometidos, mulheres grávidas, idosos e neonatos. Os sintomas clínicos envolvem infecção do sistema nervoso central e bacteremia, podendo causar também endocardite, aborto, parto prematuro e septicemia neonatal (FARBER e PETERKIN, 1991; JACQUET *et al.*, 2000). A taxa de mortalidade pode atingir até 70% em casos de meningite e exceder 80% em casos de infecção em neonatos (MILILLO *et al.*, 2012), o que demonstra a severidade da infecção.

A dose infecciosa mínima para a ocorrência da listeriose pode variar de acordo com a cepa e com a susceptibilidade do indivíduo infectado. Em alimentos implicados em casos de surtos de listeriose, Tompkin (2002) relata que o nível de contaminação geralmente excede 1000 UFC/g ou UFC/mL de alimento. No entanto, populações de 100 UFC/g já foram reportadas por Forsythe (2005) e Jemmi e Stephan (2006) em casos de listeriose.

Diversos alimentos têm sido envolvidos em casos esporádicos e surtos de listeriose, entretanto, alguns grupos de alimentos são mais importantes como veículos de *L. monocytogenes*. Entre eles, os produtos prontos para consumo, principalmente os derivados de carne ou peixe, estocados à temperatura de refrigeração e com vida-de-prateleira longa são considerados os de maior risco (GOLDFINE e SHEN, 2007).

Entre os alimentos mais suscetíveis à contaminação por *L. monocytogenes* estão os embutidos cárneos como pode ser constatado pelos inúmeros surtos envolvendo esses alimentos (Tabela 1). Segundo o artigo 412 do Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA), embutidos cárneos são definidos como produtos elaborados com carnes ou outros tecidos animais comestíveis, curados ou não, defumados e dessecados ou não, tendo como envoltório natural tripas, bexigas ou outras membranas animais ou envoltório artificial apropriado (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, 2013).

Uma das fontes de contaminação dos embutidos por *L. monocytogenes* é o uso de matéria-prima contaminada. Nos embutidos cujo processamento envolve apenas a etapa de cura, o longo processo de maturação permite a multiplicação desse micro-organismo. Já naqueles produtos cujo processamento envolve apenas o tratamento térmico, caso a contaminação por *L. monocytogenes* ocorra após esta etapa, a multiplicação é favorecida pela ausência de micro-organismos competidores (GOMBAS *et al.*, 2003).

Tabela 1. Surtos de listeriose relacionados ao consumo de produtos cárneos prontos para o consumo entre os anos de 2000 a 2012.

Ano	País	Alimento envolvido	Nº de casos / Óbitos	Referência
2012	Nova Zelândia	Salame e "pepperoni rolls"	6 (3 mortes)	New Zealand Public Health Surveillance Report (2012)
2010	EUA	"hog head cheese" (alimento à base de cabeça e pé de suínos)	14	Delaune <i>et al.</i> (2011)
2009	Austrália	Frango cozido em cubos	36 (3 mortes)	Stafford (2010)
2008	Canadá	Produtos cárneos prontos para o consumo	80 (23 mortes)	Birk-Urovitz (2011)
2008	Alemanha	Salsicha	16 (5 mortes)	Winter <i>et al.</i> (2009)
2008	Austrália	Sanduíche de frango e "wrap" de frango	29 (2 abortos)	NSW Food Authority (2009)
2002	EUA	Carne de peru fatiado	54 (8 mortes)	Gottlieb <i>et al.</i> (2006)
2001	EUA	Carne de peru pré-cozida e fatiada	16	Frye <i>et al.</i> (2002)
2000	EUA	"Deli" carne de peru	30 (4 mortes)	Olsen <i>et al.</i> (2005)
2000	Austrália	"Corned beef" e presunto	31	Sim <i>et al.</i> (2002)
2000	França	Língua de porco	32 (10 mortes)	de Valk <i>et al.</i> (2001)
2000	França	"Rillettes" (patê à base de carne de porco)	10 (3 mortes)	de Valk <i>et al.</i> (2001)

Na tentativa de atender à demanda do mercado consumidor na busca por praticidade, é cada vez mais comum encontrar embutidos cárneos comercializados em fatias. O processo de fatiamento pode ser realizado tanto na fábrica como nos pontos de comercialização. Entretanto, Weiss *et al.* (2010) destacam a preferência dos consumidores por embutidos fatiados na indústria, uma vez que estes apresentam maior vida-de-prateleira. Os embutidos cárneos fatiados comercializados no mercado brasileiro apresentam entre 30 a 60 dias de vida-de-prateleira. O maior prazo de vida-de-prateleira é atribuído à embalagem do produto a vácuo ou em atmosfera modificada, sendo estas características, fatores que não limitam a sobrevivência e multiplicação de *L. monocytogenes*.

De acordo com Johnson, Doyle e Cassens (1990), embutidos cárneos fatiados e embalados a vácuo podem sofrer contaminação por *L. monocytogenes* durante o fatiamento, sendo que a multiplicação das células ocorre durante a estocagem sob refrigeração. De fato, este micro-organismo é conhecido pela

capacidade de formação de biofilmes e estabelecimento em unidades processadoras de alimentos através da colonização de equipamentos, drenos de pisos, etc, permanecendo como microbiota residente por meses ou até anos (ZHAO, DOYLE e ZHAO, 2004; CHIARINI, 2007; DIAS, 2008).

A Tabela 2 apresenta um resumo da ocorrência de *L. monocytogenes* em produtos cárneos prontos para o consumo entre os anos de 2004 a 2015. No Brasil, *L. monocytogenes* já foi isolada de salames em peças (BORGES *et al.*; 1999); salame comercializado em fatias (BORGES *et al.* 1999; MARTINS & GERMANO, 2011; SAKATE *et al.*, 2003); peito de peru e peito de peru tipo *blanquet* comercializados em fatias (ARAÚJO *et al.*, 2002); mortadela fatiada embalada a vácuo (BERSOT *et al.*, 2008) e presunto cozido comercializado em fatias (MARTINS e GERMANO, 2011).

Em estudo realizado por Martins e Germano (2011), das 130 amostras de presunto suíno cozido e 130 amostras de salame, fatiados e embalados a vácuo, adquiridos na cidade de São Paulo, a ocorrência de *L. monocytogenes* foi de 0,8% e 6,2%, respectivamente. Uma vez que estes produtos são termoprocessados, os autores concluíram que a contaminação ocorreu durante a etapa de fatiamento pós-processamento. A maior incidência de *L. monocytogenes* em amostras de salame fatiado é atribuída às características desse alimento, que possui um alto teor de gordura e baixa umidade. Segundo os autores, a formação de uma camada de gordura na lâmina de fatiamento pode proteger as células de *L. monocytogenes* e facilitar a disseminação da contaminação.

Tabela 2. Ocorrência de *Listeria monocytogenes* em produtos cárneos prontos para o consumo entre os anos de 2004 a 2015.

Ano	País	Alimento	Nº de amostras	Principais resultados / Positividade (%) para <i>Listeria monocytogenes</i>	Referência
2015	EUA	Produtos cárneos curados e não curados prontos para o consumo	1883	39 (2,1%)	Ahmed <i>et al.</i> (2015)
2014	Itália	Salsicha fermentada	230	18 (8%)	Meloni <i>et al.</i> (2014)
2012	Sudão	Produtos cárneos prontos para o consumo	250	34 (13,6%)	Alsheikh, Mohammed e Abdalla (2013)
2010	Itália	Salame inteiro	140	64 (45,7%)	Petruzelli <i>et al.</i> (2010)
2010	Itália	Salame fatiado embalado a vácuo	112	23 (20,5%)	Di Pinto <i>et al.</i> (2010)
2009	Austrália	Carne defumada fatiada e embalada a vácuo	154	6 (3,9%), população <i>L. monocytogenes</i> <10 UFC/g	NSW Food Authority (2009)
2009	Reino Unido	Carne assada fatiada	1321	29 (20,5%), 3 amostras apresentaram população do patógeno >10 UFC/g	Meldrum <i>et al.</i> (2010)
2009	República Tcheca	Produtos cárneos prontos para o consumo fatiados e inteiros	1044	36 (3,4%)	Gelbíčov e Karpíšková (2009)
2008	Espanha	Produtos cárneos prontos para o consumo embalados a vácuo	220	6 (2,7%), 2 amostras apresentaram população do patógeno entre 100 e 1000 UFC/g	Garrido, Vitasa e GarciaJalóna (2009)
2006	Grécia	Salame inteiro	300	30 (10%)	Apostolos <i>et al.</i> (2006)
2005	Itália	Salame inteiro e fatiado	1020	231 (22,7%)	Gianfranceschi <i>et al.</i> (2006)
2005	Grécia	Produtos cárneos prontos para o consumo fatiados e inteiros	159	4 (2,5%), população <i>L. monocytogenes</i> <10 UFC/g	Angelidis e Koutsoumanis (2006)
2004	Nova Zelândia	Presunto fatiado	104	1 (0,96%)	Wong <i>et al.</i> (2005)
2004	Espanha	Salame, salsicha e chouriço	345	23 (6,7%)	Vitas <i>et al.</i> (2004)

Gombas *et al.* (2003) avaliaram a sobrevivência de *L. monocytogenes* em alimentos prontos para o consumo e relataram uma maior prevalência de *L. monocytogenes* em embutidos cárneos fatiados nos estabelecimentos de venda comparados aos embutidos cárneos fatiados pela indústria. No entanto, a população do patógeno foi significativamente maior nas amostras provenientes da indústria, uma vez que a maior vida-de-prateleira do embutido processado propiciou um aumento da multiplicação do patógeno no alimento.

Além de *L. monocytogenes*, outros micro-organismos patogênicos já foram isolados de embutidos cárneos, principalmente de salames coloniais comercializados na região sul do Brasil. Dentre estes micro-organismos destacam-se *Staphylococcus* coagulase positiva em contagens acima do permitido pela legislação brasileira (HOFFMAN *et al.*, 1997; LOBO *et al.*, 2001; RITTER *et al.*, 2003), presença de *Salmonella* spp (HOFFMAN *et al.*, 1997; MAGNANI *et al.*, 2000).

Além da busca por alternativas que assegurem a inocuidade dos embutidos cárneos, é relevante para a indústria de alimentos a busca por alternativas que retardem a deterioração desses produtos minimizando suas perdas econômicas. Os micro-organismos associados à deterioração de embutidos cárneos variam de acordo com qualidade da matéria-prima utilizada para a fabricação desses produtos e com as condições de embalagem e armazenamento do produto final.

Em geral, a deterioração de embutidos cárneos está relacionada, principalmente, com a multiplicação de *Pseudomonas* spp, leveduras e bactérias lácticas. Estes micro-organismos estão associados à produção de pigmentos, limosidade superficial, aumento da acidez do produto e estufamento de embalagens (ARNAUT-ROLLIER *et al.*, 1999; DOULGERAKI *et al.*, 2012; NIELSEN *et al.*, 2008; NYCHAS *et al.*, 2008).

Tendo em vista os aspectos abordados e com o intuito de minimizar esse problema para a indústria de alimentos e também para a saúde pública, este projeto foi desenvolvido.

2 OBJETIVOS

Objetivo geral:

- Avaliar o potencial de utilização de filme biodegradável à base de alginato incorporado de agentes antimicrobianos naturais como embalagem primária para embutido cárneo fatiado embalado a vácuo no controle de *L. monocytogenes*.

Objetivos específicos:

- Determinar a concentração bactericida mínima de óleos essenciais capaz de inibir a multiplicação de *L. monocytogenes*;

- Avaliar do efeito da combinação de óleos essenciais e combinação de compostos ativos presentes em óleos essenciais para a inibição de *L. monocytogenes*;

- Avaliar a combinação de compostos ativos presentes em óleos essenciais para a inibição de *L. monocytogenes*, *Pseudomonas* spp e *Salmonella* spp;

- Avaliar *in vitro* a eficiência do filme antimicrobiano à base de alginato no controle de *L. monocytogenes* e *Pseudomonas* spp;

- Avaliar *in situ* a eficiência do filme antimicrobiano à base de alginato no controle de *L. monocytogenes*;

- Avaliar a disponibilidade dos compostos ativos incorporados ao filme à base de alginato pela quantificação de compostos fenólicos totais.

- Caracterizar o filme antimicrobiano à base de alginato frente às propriedades mecânicas e de barreira;

- Verificar a aceitação do produto pelo consumidor através da análise sensorial.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL

3.1.1 MICRO-ORGANISMOS UTILIZADOS

3.1.1.1 *Listeria monocytogenes*

Foram utilizados seis isolados de *L. monocytogenes* assim distribuídos: duas cepas de referência (*L. monocytogenes* Scott A e *L. monocytogenes* ATCC 35152); um isolado de salame (*L. monocytogenes* sorovar 1/2c) e um isolado de linguiça (*L. monocytogenes* sorovar 1/2a) gentilmente doados pela Fundação Oswaldo Cruz; e, um isolado de carcaça de frango (*L. monocytogenes*), um isolado clínico (*L. monocytogenes* sorovar 4b) provenientes da coleção de culturas do Laboratório de Microbiologia de Alimentos da FCF-USP.

3.1.1.1.1 *Pseudomonas spp* e *Salmonella spp*

Foram utilizadas três cepas de *Pseudomonas* spp assim distribuídas: uma cepa de *P. fluorescens* e uma cepa de *P. putida* isoladas de carne de frango, e uma cepa de *P. aeruginosa* ATCC 27853 provenientes da coleção de culturas do Laboratório de Microbiologia de Alimentos da FCF-USP; e, uma cepa de *Salmonella* Enteritidis e uma cepa de *Salmonella* Give, ambas isoladas de produtos cárneos e doadas pelo Laboratório SFDK.

3.1.2 ÓLEOS ESSENCIAIS

Os seguintes óleos essenciais foram avaliados: óleo essencial de alho (Fuchs Gewürze, Brasil), óleo essencial de cravo (Duas Rodas, Brasil), óleo essencial de cravo (Apliquimica, Brasil), óleo essencial de laranja (Duas Rodas, Brasil), óleo essencial de laranja (Dierberger, Brasil), óleo essencial de limão (Dierberger, Brasil), óleo essencial de limão (Duas Rodas, Brasil) e óleo essencial de menta (Duas Rodas, Brasil). Todas as amostras foram doadas pelos respectivos fornecedores.

3.1.3 COMPOSTOS ATIVOS

Os compostos ativos eugenol e limoneno com 99,9% de grau de pureza garantido pelo fabricante foram adquiridos da empresa Sigma Aldrich (Estados Unidos).

3.1.4 MATÉRIAS-PRIMAS UTILIZADAS NO DESENVOLVIMENTO DOS FILMES À BASE DE ALGINATO

As matérias-primas, todas de grau alimentício, utilizadas para a elaboração dos filmes foram: alginato de sódio (I-3F-80, Vogler, Brasil), glicerina bi-destillada (Mix, Brasil) e cloreto de cálcio (solução a 20%, Doce Aroma, Brasil).

3.2 MÉTODOS

3.2.1 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA DE ÓLEOS ESSENCIAIS

3.2.1.1 Preparo da emulsão

O preparo da emulsão de óleo essencial e dos compostos ativos em amido modificado foi baseado em metodologia descrita por Oussalah *et al.* (2006b). Cada óleo essencial avaliado foi homogeneizado em homogeneizador de bancada (Ultra Turrax TP18/1059, Ika, Alemanha) a 20000 rpm por 2 min com uma solução estéril de amido modificado 10% (Purity gum Be, National Starch Food Innovation, Estados Unidos) de maneira a obter uma concentração final de 10% de óleo essencial. O preparo da emulsão foi realizado de forma asséptica em fluxo laminar.

3.2.1.2 Método da diluição em caldo

Para a determinação da CIM dos óleos essenciais e compostos ativos foi utilizada a metodologia descrita por Gutierrez, Barry-Ryan e Bourke (2008), com modificações. Nesta metodologia, 1 mL da emulsão de OE a 10% foi adicionado a

um tubo contendo 9 mL de caldo Mueller-Hinton (Oxoid, Reino Unido) a fim de se obter a concentração final de 1% (10000 ppm) de OE diluído no meio de cultura. Diluições seriadas foram realizadas para obter concentrações de 0,1% (1000 ppm) e 0,01% (100 ppm) de OE e, a partir destas, concentrações intermediárias foram obtidas. Em seguida, 100 µL de cada isolado foi individualmente inoculado a uma população final de 10^3 UFC/mL e incubados a 37° C por 24h. Para cada condição estudada foi utilizado um controle positivo composto por um tubo contendo o micro-organismo inoculado em caldo Mueller-Hinton sem o OE e um controle negativo composto por um tubo contendo o caldo Mueller-Hinton adicionado de OE na concentração estudada. Após o período de incubação, semeou-se uma alíquota de 100 µL dos tubos que não apresentaram turbidez – indicativo de ausência de multiplicação microbiana – em ágar Trypticase de Soja suplementado com extrato de levedura (TSAYE, Oxoid, Reino Unido). Em seguida, as placas foram incubadas a 37° C por 24h a 48h. A CIM foi definida como a menor concentração de OE onde há ausência a multiplicação do micro-organismo.

3.2.2 ELABORAÇÃO DOS FILMES À BASE DE ALGINATO

O processo de elaboração dos filmes foi baseado na metodologia descrita por Igarashi (2010) e está representado na Figura 1. Inicialmente, solubilizou-se a glicerina bi-destilada (2%) em água destilada sob agitação a 1000 rpm por 5 min (Fisatom, mod. 713, Brasil) e, em seguida, adicionou-se a emulsão de OE mantendo a agitação a 1000 rpm por 5 min. Após, o alginato de sódio (3%) foi adicionado sob agitação a 1000 rpm por 20 min. A solução filmogênica obtida foi mantida em descanso por aproximadamente 2 horas para a eliminação de bolhas de ar que poderiam interferir nas propriedades mecânicas e de barreira do filme. Posteriormente, foi realizado o porcionamento da solução filmogênica em placas de Petri (140 x 15 mm). Após a distribuição manual da solução pela placa de Petri, as amostras foram levadas à estufa a 40° C por 20h para secagem. Após a secagem, foi realizada a etapa de *crosslinking* complementar na qual 50 mL de solução de cloreto de cálcio a 2% foi adicionada às placas contendo os filmes já secos em estufa. Após 5 min de contato, a solução de cloreto de cálcio foi

removida da placa e o excesso foi retirado por lavagem com água destilada. Os filmes foram levados para secagem em estufa a 40° C e acondicionados em dessecador com umidade relativa a 75% (solução saturada de cloreto de sódio padrão analítico). Os filmes apresentaram espessura final de aproximadamente 100 µm.

Figura 1. Representação esquemática do processo de elaboração dos filmes conforme descrito por Igarashi, 2010

3.2.3 AVALIAÇÃO DO EFEITO DA COMBINAÇÃO DE OE SOBRE A REDUÇÃO DA POPULAÇÃO DE *L. monocytogenes*

Os OE de alho (Fuchs Gewurze), OE de cravo (Duas Rodas), OE de limão (Duas Rodas) e OE de menta (Fuchs Gewurze) foram submetidos à avaliação de sinergismo por apresentarem os menores valores de CIM. Para isso, adotou-se o Delineamento Fatorial Fracionário 2^{4-1} com três pontos centrais, totalizando 11 ensaios, sendo +1: máxima concentração, -1: mínima concentração, 0: ponto

central. As variáveis estudadas foram: (a) concentração de OE de alho, sendo o limite mínimo (-1=0,00%) e o limite máximo (+1=0,05%), (b) concentração de OE de cravo, sendo o limite mínimo (-1=0,00%) e o limite máximo (+1=0,025%), (c) concentração de OE de limão, sendo o limite mínimo (-1=0,00%) e o limite máximo (+1=0,25%) e (d) concentração de OE de menta, sendo o limite mínimo (-1=0,00%) e o limite máximo (+1=0,25%), conforme apresentado na Tabela 3.

Tabela 3. Valores codificados e valores originais (%) para as variáveis avaliadas no Delineamento Fatorial Fracionário 2^{4-1} com três pontos centrais

Ensaio	Valores codificados				Valores originais (%)			
	F1	F2	F3	F4	OE alho	OE cravo	OE limão	OE menta
1	-1	-1	-1	-1	0,00	0,00	0,00	0,00
2	+1	-1	-1	+1	0,05	0,00	0,00	0,25
3	-1	+1	-1	+1	0,00	0,025	0,00	0,25
4	+1	+1	-1	-1	0,05	0,025	0,00	0,00
5	-1	-1	+1	+1	0,00	0,00	0,25	0,25
6	+1	-1	+1	-1	0,05	0,00	0,25	0,00
7	-1	+1	+1	-1	0,00	0,025	0,25	0,00
8	+1	+1	+1	+1	0,05	0,025	0,25	0,25
9	0	0	0	0	0,025	0,013	0,13	0,13
10	0	0	0	0	0,025	0,013	0,13	0,13
11	0	0	0	0	0,025	0,013	0,13	0,13

Os OE foram combinados e adicionados a um tubo contendo 10 mL de caldo Mueller-Hinton a fim de se obter o OE diluído em meio de cultura na concentração estabelecida pelo delineamento experimental. Em seguida, 100 μ L de cada isolado foi individualmente inoculado a uma concentração final de 10^6 UFC/mL e incubados a 37° C por 24h. Após o período de incubação, os tubos foram submetidos a diluições seriadas decimais em solução peptonada 0,1% e uma alíquota de 100 μ L foi semeada, em duplicata, na superfície de placas contendo ágar TSAYE. As placas foram incubadas a 37° C por 24h a 48h e o resultado foi expresso em UFC/mL.

3.2.4 AVALIAÇÃO DO SINERGISMO DOS COMPOSTOS ATIVOS PRESENTES NO OE DE CRAVO E OE DE LIMÃO SOBRE A REDUÇÃO DA POPULAÇÃO DE *L. monocytogenes*

Para a confirmação da existência de sinergismo entre os OE de cravo e OE de limão, os compostos ativos eugenol e limoneno presentes em maior concentração na composição destes óleos, respectivamente, foram avaliados seguindo o Delineamento Composto Central Rotacional 2^2 (DCCR 2^2) com três pontos centrais, sendo +1: máxima concentração, -1: mínima concentração, 0: ponto central, +1,41: $+\alpha$ e -1,41: $-\alpha$. As variáveis estudadas foram: (a) concentração de eugenol, sendo o limite mínimo (-1,41=0,00%) e o limite máximo (+1,41=0,0125%) e (b) concentração de limoneno, sendo o limite mínimo (-1,41=0,00%) o valor determinado pela determinação da concentração mínima inibitória e o limite máximo (+1,41=0,05%), conforme apresentado na Tabela 4

Tabela 4. Valores codificados e valores originais utilizados no Delineamento Central Composto Rotacional DCCR 2^2

Ensaio	Valores codificados		Valores originais (%)	
	F1	F2	Eugenol	Limoneno
1	-1	-1	0,0018	0,0073
2	+1	-1	0,0106	0,0073
3	-1	+1	0,0018	0,043
4	+1	+1	0,0106	0,043
5	-1,41	0	0,00	0,025
6	+1,41	0	0,0125	0,025
7	0	-1,41	0,00625	0,00
8	0	+1,41	0,00625	0,05
9	0	0	0,00625	0,025
10	0	0	0,00625	0,025
11	0	0	0,00625	0,025

Os compostos ativos eugenol e limoneno foram combinados e adicionados a um tubo contendo 10 mL de caldo Mueller-Hinton a fim de se obter os compostos em meio de cultura na concentração estabelecida pelo delineamento experimental. Em seguida, 100 μ L de cada isolado foi individualmente inoculado a uma concentração final de 10^6 UFC/mL e incubados a 37° C por 24h. Após o período de incubação, os tubos foram submetidos a diluições seriadas em solução peptonada 0,1% e uma alíquota de 100 μ L foi semeada, em duplicata, na

superfície de placas contendo ágar TSAYE. As placas foram incubadas a 37° C por 24h a 48h e o resultado foi expresso em UFC/mL.

3.2.5 AVALIAÇÃO DO SINERGISMO DOS COMPOSTOS ATIVOS PRESENTES NO OE DE CRAVO E OE DE LIMÃO SOBRE A REDUÇÃO DA POPULAÇÃO DE *Pseudomonas* spp e *Salmonella* spp

De maneira análoga ao apresentado no item 3.2.4 para a avaliação da existência de sinergismo entre os compostos ativos eugenol e limoneno, foram realizados ensaios para os isolados de *Pseudomonas* spp e *Salmonella* spp seguindo o Delineamento Composto Central Rotacional 2² (DCCR 2²) com três pontos centrais. As variáveis estudadas foram: (a) concentração de eugenol, sendo o limite mínimo (-1,41=0,00%) e o limite máximo (+1,41=0,20%) e (b) concentração de limoneno, sendo o limite mínimo (-1,41=0,00%) o valor determinado pela determinação da concentração mínima inibitória e o limite máximo (+1,41=0,40%), conforme apresentado na Tabela 5.

Tabela 5. Valores codificados e valores originais utilizados no Delineamento Central Composto Rotacional DCCR 2²

Ensaio	Valores codificados		Valores originais (%)	
	F1	F2	Eugenol	Limoneno
1	-1	-1	0,05	0,10
2	+1	-1	0,15	0,10
3	-1	+1	0,05	0,30
4	+1	+1	0,15	0,30
5	-1,41	0	0,00	0,20
6	+1,41	0	0,20	0,20
7	0	-1,41	0,10	0,00
8	0	+1,41	0,10	0,40
9	0	0	0,10	0,20
10	0	0	0,10	0,20
11	0	0	0,10	0,20

Os compostos ativos eugenol e limoneno foram combinados e adicionados a um tubo contendo 10 mL de caldo Mueller-Hinton a fim de se obter os compostos em meio de cultura na concentração estabelecida pelo delineamento experimental. Em seguida, 100 µL de cada isolado foi individualmente inoculado a uma concentração final de 10⁶ UFC/mL e incubados a 37° C por 24h. Após o período de incubação, os tubos foram submetidos a diluições seriadas decimais

em solução peptonada 0,1% e uma alíquota de 100 μL foi semeada, em duplicata, na superfície de placas contendo ágar tripticase soja (TSA, Oxoid, Reino Unido). As placas foram incubadas a 37° C por 24h e o resultado foi expresso em UFC/mL.

3.2.6 ANÁLISES DE CARACTERIZAÇÃO DO FILME ANTIMICROBIANO À BASE DE ALGINATO

3.2.6.1 Atividade antimicrobiana *in vitro* dos filmes

A determinação da atividade antimicrobiana *in vitro* dos filmes foi determinada pelo método da difusão em ágar de acordo com metodologia proposta por Maizura *et al.* (2007). Os filmes foram cortados em discos de 5 mm de diâmetro e dispostos sobre placas de Petri contendo ágar Mueller-Hinton (Oxoid) previamente semeado com 200 μL do inóculo (10^5 a 10^6 UFC/mL) de cada micro-organismo avaliado. As placas foram avaliadas através da ausência de multiplicação microbiana ao redor dos filmes e o diâmetro total da zona de inibição foi mensurado em mm. A diferença entre área total da zona de inibição e a área do filme foi definida como a área de inibição (mm^2).

3.2.6.2 Propriedades mecânicas

Para a determinação das propriedades mecânicas, corpos de prova retangulares (largura 2,5 cm e comprimento mínimo de 10 cm) dos filmes foram fixados entre as garras de tensão (probe A/TGT) e submetidas aos testes de tração, utilizando o analisador de textura (TA.XT2i, SMS, Reino Unido) conforme metodologia descrita na norma American Society for Testing Materials – ASTM D882-10 (2010). Para cada amostra de filme utilizado na análise, cinco medidas da espessura foram obtidas, em posições aleatórias, pelo uso do micrômetro de ponta plana.

A distância entre as garras de tensão foi definida em 50 mm e a velocidade do ensaio foi definida em 0,001 m/s, conforme metodologia descrita por Zactiti e Kieckbusch (2006).

Os corpos de prova foram preparados após um acondicionamento mínimo de 48 h em dessecador (UR = 75%, T média = 25° C). Após a preparação, os mesmos foram novamente acondicionados, por um período mínimo de 48 h, em dessecador, com o objetivo de recondicionar os filmes após a manipulação.

A resistência máxima à tração foi calculada através da equação:

$$R_{\text{máx}} = \frac{F_{\text{máx}}}{A_{\text{min}}} \quad \text{eq. 1}$$

Sendo:

$R_{\text{máx}}$ = resistência máxima à tração (Pa)

$F_{\text{máx}}$ = força registrada no ponto de ruptura (N)

A_{min} = área mínima inicial do corpo de prova (m²)

Considerando a área mínima calculada como:

$$A_{\text{min}} = e_{\text{min}} \times L$$

e_{min} = espessura mínima inicial do corpo de prova (m)

L = largura inicial do corpo de prova (m)

O alongamento na ruptura foi calculado utilizando-se a equação:

$$\text{Alongamento na ruptura (\%)} = \left(\frac{L_T - L_0}{L_0} \right) \times 100 \quad \text{eq. 2}$$

Em que:

L_T = comprimento total do corpo de prova no momento da ruptura (m)

L_0 = distância inicial entre as garras (m)

Os valores para resistência máxima à tração e alongamento na ruptura foram obtidos a partir da média de 10 amostras de cada ensaio realizados em duplicata.

3.2.6.3 Propriedades de barreira

3.2.6.3.1 Permeabilidade ao vapor de água

A determinação das propriedades de barreira ao vapor de água dos filmes foi determinada pelo método gravimétrico de acordo com a American Society for Testing and Materials – ASTM E96/E96M-10 (2010). O método gravimétrico consiste na avaliação do ganho de massa do conjunto dessecante composto pela sílica (ativada a 105° C por 24 h, UR=0%), filme e placa de Petri. Para a análise, o filme foi fixado na parte superior da placa de Petri com auxílio de um elástico, sendo que a lateral foi coberta com uma camada de fita adesiva, de forma que somente a área da parte superior da placa coberta pelo filme permanecesse exposta. Como branco, foi utilizado o conjunto constituído pela placa de Petri e filme, sem a presença da sílica. Tanto o conjunto dessecante como o branco foram armazenados em dessecadores com umidade relativa de 75% (cloreto de sódio padrão analítico). A massa do sistema foi quantificada em intervalos de 24 h durante 7 dias (ZACTITI e KIECKBUSCH, 2006). Para cada ensaio, foram utilizados dois brancos e dois conjuntos dessecantes.

Para a determinação da taxa de permeabilidade ao vapor de água (TPVA), foram obtidas cinco medidas de espessura com auxílio de um micromêtro (Mitutoyo, Japão) de ponta plana, em posições aleatórias, para cada amostra de filme analisada.

A TPVA foi determinada pela eq. (1):

$$TPVA = \frac{w}{t \times A} \quad \text{eq. 3}$$

Onde:

TPVA = taxa de permeabilidade ao vapor de água (g.dia⁻¹.m⁻²)

w/t = coeficiente angular do trecho reto obtido através da regressão linear da curva do ganho de massa em função do tempo (g.dia⁻¹)

A = área do filme (m²)

A permeabilidade ao vapor de água (PVA) foi determinada pela eq. (4a) e eq. (4b):

$$PVA = \frac{TPVA \times e}{ps \times (UR_1 - UR_2)} \quad \text{eq. 4a}$$

$$PVA = \frac{(w/t) \times e}{A \times ps \times (UR_1 - UR_2)} \quad \text{eq. 4b}$$

Onde:

PVA = permeabilidade ao vapor de água (g.μm.dia⁻¹.m⁻².mmHg⁻¹)

TPVA = taxa de permeabilidade ao vapor de água (g.dia⁻¹.m⁻²)

w/t = coeficiente angular do trecho reto obtido através da regressão linear da curva do ganho de massa em função do tempo (g.dia⁻¹)

e = espessura média do corpo de prova (μm)

ps = pressão de saturação do vapor de água à temperatura da análise (mmHg)

UR₁ = umidade relativa dentro do dessecador (%)

UR₂ = umidade relativa no interior da placa de Petri (%)

3.2.6.3.2 Permeabilidade ao oxigênio

Para a determinação da permeabilidade ao oxigênio foi utilizado o equipamento OXTRAN 2/21 (Mocon, Estados Unidos) conforme metodologia descrita em ASTM F1927-07 (2007).

A amostra do filme a ser analisado foi colocada, paralelamente, entre duas células do equipamento, na qual o gás oxigênio é liberado entre as duas células com a vazão de $20\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, enquanto que o gás de arraste, composto por 98% de nitrogênio e 2% de hidrogênio é liberado pelo lado externo das células com a vazão de $10\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$. A análise foi realizada em modo contínuo, sendo as leituras realizadas a cada 30 minutos. As condições estabelecidas para a realização do ensaio foram: pressão=92,7 kPa (pressão atmosférica da cidade de São Paulo), temperatura da câmara= $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ e UR câmara=75%.

A permeabilidade ao oxigênio (PO_2) é dada pela equação:

$$PO_2 = \frac{TPO_2}{\Delta p} \quad \text{eq. 5}$$

Onde:

PO_2 = permeabilidade ao oxigênio ($\text{cm}^3\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{Pa}^{-1}$)

TPO_2 = taxa de permeabilidade ao oxigênio ($\text{cm}^3\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{dia}^{-1}$)

Δp = diferença de pressão parcial de oxigênio entre os dois lados do filme (kPa)

O coeficiente de permeabilidade ao oxigênio ($P'O_2$) é calculado pela equação:

$$P'O_2 = PO_2 \times e$$

Em que:

$P'O_2$ = permeabilidade ao oxigênio ($\text{cm}^3\cdot\text{m}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{Pa}^{-1}$)

e = espessura média do filme medida em cinco posições aleatórias (mm)

3.2.6.4 Atividade de água

Para a determinação da atividade de água (Aa), amostras em triplicata de cada filme foram cortadas a fim de se obter porções de aproximadamente 5g. A mensuração da atividade de água das amostras foi realizada em medidor de atividade de água (NOVASINA Aw Center, mod. AWC 503-C, Suíça).

3.2.6.5 Avaliação da disponibilidade dos compostos ativos incorporados ao filme de alginato

A metodologia para avaliação da disponibilidade dos compostos ativos incorporados ao filme à base de alginato foi baseado em procedimento descrito por Oussalah *et al.* (2007a), com modificações. Nessa metodologia, 1 g do filme foi solubilizado em 10 mL de tampão fosfato de sódio 10M e mantido sob agitação à temperatura ambiente durante 5 min até a completa solubilização do filme. Em seguida, 200 µL da solução resultante foram homogeneizados com 200 µL do reagente Folin-Ciocalteu por 5 min. Após essa etapa, 1 mL de solução de 15% Na₂CO₃ foi adicionada e a solução foi mantida em repouso por 1 h. A absorbância foi mensurada no comprimento de onda de 760 nm utilizando o espectrofotômetro (Pharmacia Boitec, Ultrospec 2000UV/Visible Spectrophotometer, Inglaterra). Os compostos fenólicos totais foram expressos em mg de ácido gálico equivalente.

3.2.7 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS FILMES EM SALAME FATIADO

Para a determinação da atividade antimicrobiana dos filmes em salame fatiado foi utilizado somente a formulação correspondente à combinação de compostos ativos que apresentou ao maior valor de zona de inibição para todos os micro-organismos avaliados.

3.2.7.1 Preparo do inóculo de *Listeria monocytogenes*

A partir de culturas individuais de *L. monocytogenes* ATCC 35152, *L. monocytogenes* 4b e *L. monocytogenes* 1/2a, três tubos contendo 5 mL de caldo tripticase soja adicionado de 0,6% de extrato de levedura (TSBYE) foram inoculados individualmente com as cepas selecionadas e incubados a 37° C por 24 h. Após o período de incubação, transferiu-se, individualmente, 1 mL de cada cultura para erlenmeyers com 100 mL de TSBYE que foi novamente incubado a 37° C por 24 h. Após o período de incubação, 30 mL de cada cultura de *L. monocytogenes* foi transferida para tubos de centrífuga e centrifugados a 1600xg por 10 min a 4° C. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o sedimento foi ressuspensionado em 30 mL de solução peptonada 0,1%. Após este processo, 10 mL de cada cultura de células de *L. monocytogenes* ressuspensionada foi transferida para um único tubo de centrífuga, totalizando, 30 mL de cultura sendo esta considerada o “pool” de *L. monocytogenes*. Estes 30 mL foram novamente centrifugados a 1600xg por 10 min a 4° C e o sedimento ressuspensionado em solução peptonada 0,1%. Essa suspensão teve sua densidade ótica (DO) ajustada para 0,50 a 630 nm equivalente a um inóculo de 10⁸ UFC/mL, conforme padronizado previamente.

3.2.7.2 Atividade antimicrobiana dos filmes contra *L. monocytogenes* em salame fatiado

O método utilizado para a escolha das condições utilizadas na etapa de contaminação do salame foi baseado no guia para Challenge Test descrito por Anonymous (2003). Para a avaliação da atividade antimicrobiana dos filmes em salame, peças de salame tipo italiano foram adquiridas em supermercado da cidade de São Paulo. O salame foi fatiado (2 mm de espessura) em fatiador mecânico (SMS-048) e cada fatia foi colocada em embalagem plástica (espessura: 62µm; taxa de permeabilidade ao oxigênio: 1,375mL (CNTP) m³.m².dia⁻¹; taxa de permeabilidade ao vapor de água: 3,5g água m⁻².dia⁻¹) e mantidas em refrigeração até a contaminação e selagem.

Cada fatia foi contaminada superficialmente com 20 μL do inóculo a 10^6 UFC/mL a fim de se obter uma população inicial de 10^4 UFC/mL. Em seguida, foi realizado o processo de vácuo para garantir a distribuição uniforme do inóculo por toda a superfície do salame. Após essa etapa, a amostra de salame contaminado foi coberta com o filme antimicrobiano de modo que todas as faces ficassem em contato com o filme. Em seguida, foi então transferido para outra embalagem plástica e selada a vácuo, conforme apresentado na Figura 2.

Figura 2. Amostra de salame contaminado experimentalmente com *Listeria monocytogenes*, coberto com o filme antimicrobiano e embalado à vácuo

A análise foi realizada em duplicata com duas repetições. Cada experimento foi composto por uma amostra de salame fatiado inoculado com o micro-organismo teste e embalado com o filme desenvolvido, acompanhada por duas condições controle: (a) fatia de salame sem o micro-organismo e sem o filme e (b) fatia de salame com o micro-organismo e sem o filme. Todas as amostras foram armazenadas sob refrigeração a 7°C por 30 dias.

3.2.7.3 Análises microbiológicas

3.2.7.3.1 Preparo das amostras para a enumeração do micro-organismo

Para os ensaios controle onde o filme antimicrobiano não foi utilizado para a cobertura do salame, a fatia individual de salame foi pesada em saco de amostragem (Nasco, Whril-Pack, Estados Unidos) e solução peptonada 0,1% foi adicionada proporcionalmente como diluente a fim de se obter a diluição inicial 1:10, em seguida foi realizada a homogeneização da amostra em *stomacher* por 1 min. A partir desse homogeneizado, foram realizadas diluições decimais, usando como diluente solução peptonada 0,1%.

Para os ensaios onde o filme antimicrobiano foi utilizado na cobertura da fatia de salame, o filme foi removido assepticamente com auxílio de uma pinça esterilizada, previamente, à adição do diluente. As etapas posteriores foram semelhantes ao descrito anteriormente.

3.2.7.3.2 Pesquisa de *L. monocytogenes*

Para os ensaios controle, onde não foi realizada a contaminação do micro-organismo na amostra de salame, realizou-se a pesquisa de *L. monocytogenes* conforme descrito em Hitchins (2003). Nessa metodologia, 225 mL de caldo de enriquecimento para *Listeria* (Fraser, Oxoid, Reino Unido) adicionado de suplemento seletivo Fraser (Oxoid, Reino Unido) foi adicionado ao saco de amostragem contendo a amostra de 25 g de salame. O conteúdo foi homogeneizado em *stomacher* por 1 min e incubado a 37° C por 24 h e 48 h. Após 24 h e 48 h, uma alíquota foi semeada em placas contendo ágar Palcam (Oxoid, Reino Unido) e ágar Oxford (Oxoid, Reino Unido) adicionado de suplemento seletivo (Oxoid, Reino Unido) e foram incubadas a 37° C por 48 h. Colônias típicas de *Listeria* foram semeadas em ágar TSAYE e incubadas a 37° C por 24 h e submetidas à identificação bioquímica, através de testes de produção de catalase, fermentação de carboidratos e motilidade a 25° C.

3.2.7.3.3 Enumeração de *L. monocytogenes*

A partir das diluições obtidas em 3.2.7.3.1, semeou-se em duplicata por superfície 0,1 mL de cada diluição em ágar Oxford adicionado de suplemento seletivo. As placas foram incubadas a 37°C por 48h e os resultados foram expressos em UFC/g.

3.2.8 ANÁLISE SENSORIAL

A análise sensorial teve como objetivo comparar a aceitação do consumidor através do teste de preferência indireta com a utilização de uma escala hedônica de 9 pontos, onde a opinião do provador varia numa escala entre “desgostei extremamente” e “gostei extremamente”. Três amostras foram apresentadas ao provador, sendo duas amostras de salame na qual a cobertura de filme à base de alginato incorporado com eugenol e limoneno foi utilizada como separador de fatia e uma amostra controle na qual o filme não foi utilizado.

Foram utilizadas amostras comerciais de salames fatiados e embalados à vácuo provenientes do mesmo lote. Tanto as amostras controle como as amostras na qual os filmes foram utilizados, foram armazenados por 2 dias a 7°C previamente a realização da análise sensorial.

O painel sensorial foi composto por 35 provadores não treinados, com idade entre 18 a 57 anos que avaliaram o sabor, aroma e aparência do produto. As amostras ficaram acondicionadas em refrigerador doméstico até o momento da realização da análise sensorial, sendo a camada de filme à base de alginato incorporado com eugenol e limoneno retirada antes da análise pelo provador. Cada amostra foi apresentada em pratos brancos descartáveis, codificados com números de três dígitos, conforme apresentado na Figura 3. As amostras foram avaliadas sob luz branca em cabines individuais, no Laboratório de Análise Sensorial de Alimentos, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP, em São Paulo, SP.

O Termo de Aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE e a ficha utilizada para a avaliação sensorial estão apresentados no ANEXO 2.

Figura 3. Apresentação das amostras de salame para o teste de aceitação

3.2.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados da avaliação da combinação de OE e da combinação de compostos ativos para a redução da população de *L. monocytogenes*, *Pseudomonas* spp. e *Salmonella* spp. foram avaliados através do *software* STATISTICA 10.0 (Statsoft Inc., USA), considerando o erro puro e o intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$). Os resultados obtidos a partir do planejamento experimental foram ajustados a um modelo do tipo:

$$E(y) = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_{11} x_1^2 + \beta_{22} x_2^2 + \beta_{12} x_1 x_2$$

Em que: $E(y)$ é a resposta predita pelo modelo, β_0 é a constante, β_1 , β_2 , β_{11} , β_{22} e β_{12} são os coeficientes da regressão, e x_1 e x_2 representam as variáveis independentes estudadas. A qualidade do ajuste do modelo aos dados experimentais foi verificada através da análise de variância (ANOVA) da

regressão e o coeficiente de determinação (R^2), na qual as repetições nos pontos centrais forneceram graus de liberdade para obtenção do erro puro e conseqüentemente, análise da falta de ajuste do modelo.

O Teste de Tukey foi aplicado para a análise de diferenças significativas entre os ensaios considerando o intervalo de confiança de 95%.

4 RESULTADOS

4.1 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA DE ÓLEOS ESSENCIAIS

Os OE utilizados foram selecionados a partir dos resultados encontrados por Igarashi (2010) empregando, porém, a metodologia de diluição em caldo e avaliando diferentes fornecedores de OE. A emulsão OE/solução de amido modificado não permitia visualizar a multiplicação bacteriana através da turvação da emulsão. Por isso, optamos por semear o material em TSA ou TSA+YE (*L. monocytogenes*). Com esta modificação, foi determinada a concentração bactericida mínima pois foi constatada a não multiplicação bacteriana.

Conforme apresentado na Tabela 6, a CBM para *L. monocytogenes* variou de 0,05% para o OE de cravo (Duas Rodas) a 0,5% para os OE de laranja (Duas Rodas), OE de laranja (Dierberger), OE de limão (Duas Rodas) e OE de menta (Fuchs Gewurze). O OE de laranja foi efetivo somente para a cepa de referência *L. monocytogenes* Scott A, enquanto para os demais isolados a concentração máxima estabelecida pelo método (1%) não foi suficiente para a completa inibição do patógeno. Resultado semelhante foi observado para o OE de limão (Dierberger) que promoveu a inibição apenas das cepas de referência *L. monocytogenes* Scott A e *L. monocytogenes* ATCC 35152.

Apesar da existência de inúmeros trabalhos avaliando a eficiência de OE como agente antimicrobiano, a comparação de resultados é dificultada pelas diferenças na metodologia adotada pelos autores. De acordo com Mann e Markmam (1998), as metodologias comumente empregadas para a avaliação da CIM de OE são baseadas nos métodos de difusão e métodos de diluição em ágar ou caldo. Além dessas, as diferenças no processo de destilação utilizado para a obtenção do OE e diferenças no genótipo da planta e a sazonalidade da colheita da planta contribuem para a variação dos resultados (BURT, 2004; BURT e REINDERS, 2003). Portanto, os resultados desta pesquisa não foram comparados com os obtidos por outros autores

Tabela 6. Concentração bacteriana mínima (CBM) de óleos essenciais para *Listeria monocytogenes* Scott A (Lm Scott A), *L. monocytogenes* ATCC 35152 (Lm ATCC 35152), *L. monocytogenes* sorovar 1/2c (Lm 1/2c), *L. monocytogenes* sorovar 1/2a (Lm 1/2a), *L. monocytogenes* sorovar 4b (Lm 4b) e *L. monocytogens* isolado de carcaça de frango (Lm f)

Óleo Essencial	Fornecedor	<i>Listeria monocytogenes</i> (CIM em %)					
		Scott A	ATCC 35152	1/2c (isolado salame)	1/2a (isolado linguica)	4b (isolado clinico)	f (isolado frango)
O.E. Alho	Fuchs Gewürze	0.05	0.05	0.1	0.1	0.1	0.1
O.E. Cravo	Duas Rodas	0.05	0.05	0.1	0.1	0.1	0.1
O.E. Cravo	Apliquimica	0.05	0.05	0.1	0.1	0.1	0.1
O.E. Laranja	Duas Rodas	0.5	>1.0	>1.0	>1.0	>1.0	>1.0
O.E. Laranja	Dierberger	0.5	>1.0	>1.0	>1.0	>1.0	>1.0
O.E. Limão	Duas Rodas	0.05	0.1	0.5	0.5	0.1	0.5
O.E. Limão	Dierberger	0.1	0.5	>1.0	>1.0	>1.0	>1.0
O.E. Menta	Fuchs Gewürze	0.1	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5

4.2 AVALIAÇÃO DO SINERGISMO DE OE

O Delineamento Fatorial Fracionado 2^{4-1} foi escolhido por permitir a avaliação dos efeitos das variáveis principais com a mesma segurança que se teria utilizando um planejamento completo de 28 ensaios. Segundo Rodrigues e Iemma (2005), este tipo de planejamento fornece informações quanto à importância dos efeitos sobre as respostas e se a faixa de estudo escolhida para os níveis estudados é a mais adequada, além de direcionar para o planejamento seguinte.

Os fatores escolhidos para o delineamento experimental foram os OE de alho (Fuchs Gewurze), OE de cravo (Duas Rodas), OE de limão (Duas Rodas) e OE de menta (Fuchs Gewurze) que apresentaram os menores valores de CIM para os micro-organismos avaliados. Os níveis escolhidos foram estabelecidos como a máxima concentração (nível +1) correspondente à metade da CIM obtida para o OE avaliado; a mínima concentração (-1) correspondente à ausência de OE e o ponto central (0) correspondente à metade do valor estabelecido para o nível +1.

Como nível máximo foi adotado uma concentração sub-letal de 50% do valor da CIM para a avaliação do impacto da combinação dos quatro fatores estudados sobre a resposta. Esta mesma estratégia já foi adotada por alguns autores para a avaliação do sinergismo entre as combinações de OE e outros antimicrobianos para micro-organismos patogênicos e deteriorantes (DIMITRIJEVIC *et al.*, 2007; NGUEFACK *et al.*, 2012).

A Tabela 7 apresenta os valores da população em log UFC/mL de *L. monocytogenes* Scott A, *L. monocytogenes* ATCC 35152, *L. monocytogenes* 1/2c, *L. monocytogenes* 1/2a, *L. monocytogenes* 4b e *L. monocytogenes* f, para cada ensaio definido pelo planejamento experimental.

Tabela 7. População de *L. monocytogenes* (log UFC/mL), após 24h a 37° C, obtida a partir das combinações definidas pelo Delineamento Fatorial Fracionário 2⁴⁻¹

Ensaio	População de <i>L. monocytogenes</i> (log UFC/mL)					
	Lm Scott A	Lm ATCC 35152	Lm 1/2c	Lm 1/2a	Lm 4b	Lm f
1	8,6 ± 0,11	8,6 ± 0,13	8,2 ± 0,14	8,0 ± 0,14	8,0 ± 0,13	8,1 ± 0,13
2	8,4 ± 0,12	8,5 ± 0,11	8,1 ± 0,12	8,1 ± 0,16	8,2 ± 0,14	8,3 ± 0,14
3	2,4 ± 0,21	2,5 ± 0,17	3,2 ± 0,18	3,3 ± 0,18	3,2 ± 0,11	3,2 ± 0,15
4	2,4 ± 0,19	2,4 ± 0,20	3,2 ± 0,17	3,2 ± 0,11	3,0 ± 0,12	3,1 ± 0,18
5	3,5 ± 0,14	3,5 ± 0,18	4,0 ± 0,15	4,0 ± 0,11	4,1 ± 0,18	4,2 ± 0,17
6	3,5 ± 0,16	3,5 ± 0,16	4,1 ± 0,11	4,4 ± 0,12	4,8 ± 0,19	4,8 ± 0,11
7	---	---	---	---	---	---
8	---	---	---	---	---	---
9	6,1 ± 0,11	6,4 ± 0,11	6,3 ± 0,11	6,4 ± 0,11	6,4 ± 0,11	6,4 ± 0,11
10	6,4 ± 0,12	6,3 ± 0,13	6,4 ± 0,13	6,3 ± 0,15	6,3 ± 0,14	6,4 ± 0,12
11	6,4 ± 0,15	6,5 ± 0,11	6,4 ± 0,14	6,4 ± 0,16	6,4 ± 0,13	6,3 ± 0,11

*Não houve crescimento dos isolados na maior diluição estudada pela metodologia empregada.

As Tabelas 8, 9, 10, 11, 12 e 13 apresentam os efeitos dos fatores sobre a população *L. monocytogenes* Scott A, *L. monocytogenes* ATCC 35152, *L. monocytogenes* 1/2c, *L. monocytogenes* 1/2a, *L. monocytogenes* 4b e *L. monocytogenes* f, respectivamente.

Tabela 8. Estimativa dos efeitos dos fatores OE de alho, OE de cravo, OE de limão e OE de menta para resposta da população de *L. monocytogenes* Scott A (log UFC/mL)

Fator	Efeito (log UFC/mL)	Erro padrão	t	p-valor	Lim.conf. -95%	Lim.conf. +95%
Média	4,33974	0,05285	82,1051	0,000148	4,11231	4,56716
OE alho	-0,04224	0,12395	-0,3408	0,765745	-0,57559	0,49111
OE cravo	-4,77410	0,12395	-38,5139	0,000673	-5,30745	-4,24076
OE limão	-3,68585	0,12395	-29,7347	0,001129	-4,21920	-3,15250
OE menta	-0,05410	0,12395	-0,4365	0,705093	-0,58745	0,47924

R²=0,85

Tabela 9. Estimativa dos efeitos dos fatores OE de alho, OE de cravo, OE de limão e OE de menta para resposta população de *L. monocytogenes* ATCC 35152 (log UFC/mL)

Fator	Efeito (logUFC/mL)	Erro padrão	t	p-valor	Lim.conf. -95%	Lim.conf. +95%
Média	4,37554	0,021140	206,9808	0,000023	4,28458	4,46649
OE alho	-0,02749	0,049577	-0,5545	0,634945	-0,24081	0,18582
OE cravo	-4,80059	0,04957	-96,8306	0,000107	-5,01391	-4,58728
OE limão	-3,72786	0,04957	-75,1929	0,000177	-3,94117	-3,51455
OE menta	-0,02384	0,049577	-0,4808	0,678093	-0,23715	0,18947

R²=0,85

Tabela 10. Estimativa dos efeitos dos fatores OE de alho, OE de cravo, OE de limão e OE de menta para resposta população de *L. monocytogenes* 1/2c (log UFC/mL)

Fator	Efeito (logUFC/mL)	Erro padrão	t	p-valor	Lim.conf. -95%	Lim.conf +95%
Média	4,54964	0,011343	401,106	0,000006	4,50084	4,59845
OE alho	-0,00211	0,026601	-0,079	0,943985	-0,11657	0,11234
OE cravo	-4,51859	0,026601	-169,865	0,000035	-4,63304	-4,40413
OE limão	-3,64211	0,026601	-136,916	0,000053	-3,75657	-3,52765
OE menta	-0,04131	0,026601	-1,553	0,260610	-0,15577	0,07314

R²=0,83**Tabela 11.** Estimativa dos efeitos dos fatores OE de alho, OE de cravo, OE de limão e OE de menta para resposta população de *L. monocytogenes* 1/2a (UFC/mL)

Fator	Efeito (logUFC/mL)	Erro padrão	t	p-valor	Lim.conf. -95%	Lim.conf +95%
Média	4,58257	0,012769	358,892	0,000008	4,52763	4,63751
OE alho	-0,05819	0,029945	1,943	0,191449	-0,07065	0,18704
OE cravo	-4,57889	0,029945	-152,909	0,000043	-4,70773	-4,45004
OE limão	-3,59778	0,029945	-120,146	0,000069	-3,72663	-3,46894
OE menta	-0,08564	0,029945	-2,860	0,103606	-0,21449	0,04320

R²=0,84**Tabela 12.** Estimativa dos efeitos dos fatores OE de alho, OE de cravo, OE de limão e OE de menta para resposta população de *L. monocytogenes* 4b (log UFC/mL)

Fator	Efeito (logUFC/mL)	Erro padrão	t	p-valor	Lim.conf. -95%	Lim.conf +95%
Média	4,60378	0,016742	274,980	0,000013	4,53174	4,67581
OE alho	-0,15911	0,039264	4,052	0,055846	-0,00983	0,32805
OE cravo	-4,73217	0,039264	-120,522	0,000069	-4,90111	-4,56323
OE limão	-3,39194	0,039264	-86,388	0,000134	-3,56088	-3,22300
OE menta	-0,07639	0,039264	-1,946	0,191118	-0,24533	0,09255

R²=0,83**Tabela 13.** Estimativa dos efeitos dos fatores OE de alho, OE de cravo, OE de limão e OE de menta para resposta população de *L. monocytogenes* f (log UFC/mL)

Fator	Efeito (logUFC/mL)	Erro padrão	t	p-valor	Lim.conf. -95%	Lim.conf +95%
Média	4,61591	0,019714	234,145	0,000018	4,53108	4,70073
OE alho	-0,15732	0,046233	3,403	0,076574	-0,04160	0,35625
OE cravo	-4,75938	0,046233	-102,943	0,000094	-4,95831	-4,56046
OE limão	-3,40905	0,046233	-73,736	0,000184	-3,60797	-3,21012
OE menta	-0,06807	0,046233	-1,472	0,278786	-0,26700	0,13085

R²=0,84

Os resultados mostraram que para todas as condições avaliadas, um incremento na concentração de todos os OE (nível -1 para nível +1) conduziu a um decréscimo na população de *L. monocytogenes* após o período de incubação de 24h a 37°C, porém, a população de *L. monocytogenes* foi afetada significativamente apenas pelo OE de cravo ($p < 0,05$) e OE de limão ($p < 0,05$), independente do isolado avaliado.

De um modo geral, o uso de OE de cravo promoveu uma redução de 4,7 log UFC/mL na população de *L. monocytogenes* enquanto o OE de limão promoveu uma redução de 3,5 log UFC/mL sobre essa mesma população. É relevante destacar que para as condições estudadas onde apenas estes dois OE estavam presentes (condição 7), houve a completa inativação do patógeno após o período de incubação, mostrando que o uso combinando de OE de cravo e OE de limão a 50% da CIM é tão efetivo quanto o uso isolado desses óleos. Os resultados obtidos sugerem que quando o OE de alho, OE de cravo, OE de limão e OE de menta são combinados, apenas os OE de cravo e o OE de limão apresentam indicativo de sinergismo.

Além disso, destaca-se o resultado obtido para as condições do ponto central (ensaios 9, 10 e 11), na qual a combinação de OE de alho, OE de cravo, OE de limão e OE de menta a uma concentração reduzida de 75% da CIM propiciou um efeito bacteriostático sobre a população de *L. monocytogenes*.

Quando os resultados da CIM são comparados aos resultados obtidos no Delineamento Fatorial Fracionário 2^{4-1} , observa-se que apesar do OE de menta apresentar a CIM similar ao encontrado para o OE de limão, este não apresentou impacto significativo ($p > 0,05$) para a redução da população de *L. monocytogenes*.

Segundo Burt (2004), o sinergismo é definido quando a combinação de fatores apresenta um efeito superior ao fator isolado. O efeito sinérgico da combinação de óleos essenciais e outros antimicrobianos contra micro-organismos patogênicos e deteriorantes já foi relatado por alguns autores e estão apresentados na Tabela 14.

Tabela 14. Exemplos da avaliação de sinergismo entre óleos essenciais (OE) e outros antimicrobianos em ensaios realizados *in vitro*.

Fatores combinados	Resultados obtidos	Referência
Seis OE extraídos de plantas e condimentos típicos da região do Marrocos (<i>Cyperus longus</i> , <i>Eucalyptus globulus</i> , <i>Juniperus phoenicea</i> , <i>Mentha pulegium</i> , <i>Rosmarinus officinalis</i> e <i>Thymus algeriensis</i>) e duas diferentes condições de processamento térmico	O uso de <i>M. pulegium</i> ou <i>T. algeriensis</i> promoveu a redução na temperatura em até 5º C e tempo de tratamento térmico em até 5,7 min na inativação de <i>Escherichia coli</i> O157:H7.	Ait-Ouazzou <i>et al.</i> , 2012
Seis OE (<i>Cinnamomum cassia</i> , <i>Cymbopogon nardus</i> , <i>Brassica hirta</i> , <i>Origanum vulgare</i> , <i>Thymus vulgaris</i> e <i>Satureja montana</i>) e três bacteriocinas (nisina, pediocina e MT104, bacteriocina produzida por <i>Enterococcus faecium</i>)	Efeito sinérgico e efeito aditivo para algumas combinações estudadas, com destaque para a combinação entre <i>O. vulgare</i> e nisina contra <i>L. monocytogenes</i> e <i>T. vulgaris</i> e nisina contra <i>S. Typhimurium</i> .	Turgis <i>et al.</i> , 2012
OE alho (<i>Allium sativum</i>), nisina e diferentes combinações de pH e cloreto de sódio	O pH é o fator que limita a existência de sinergismo entre o OE alho e nisina no controle de <i>L. monocytogenes</i> . Para pH acima de 5,6 a combinação de OE alho e nisina reduziu significativamente a população de <i>L. monocytogenes</i> quando comparada com OE alho e nisina avaliados isoladamente.	Rohani <i>et al.</i> , 2011
OE canela, OE tomilho e OE cravo	Somente o efeito aditivo foi observado para combinações de OE canela e OE tomilho. O efeito isolado de OE canela foi mais efetivo contra todos os micro-organismos avaliados (<i>B. cereus</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> e <i>S. Typhimurium</i>).	Fei <i>et al.</i> , 2011

4.3 AVALIAÇÃO DO SINERGISMO DOS COMPOSTOS ATIVOS PRESENTES NO OE DE CRAVO E OE DE LIMÃO CONTRA *Listeria monocytogenes*

A partir dos resultados obtidos com o Delineamento Fatorial Fracionado 2⁴⁻¹, que indicou um maior efeito dos OE de cravo e OE de limão sobre a redução da população de *L. monocytogenes*, as concentrações de eugenol e limoneno, compostos ativos presentes em maior concentração nesses OE, respectivamente, foram estudadas através de um Delineamento Central Composto Rotacional 2² com 4 pontos axiais e 3 repetições nos pontos centrais.

Para a escolha dos níveis a serem utilizados neste planejamento, a CIM de eugenol e limoneno foi avaliada de maneira análoga à descrita no Item 3.2.1.2. Os níveis escolhidos foram estabelecidos como a máxima concentração (nível +1,41) correspondente à metade da CIM obtida para o composto ativo avaliado; a mínima concentração (-1,41) correspondente à ausência do composto ativo e o ponto central (0) correspondente à metade do valor estabelecido para o nível +1,41. A CIM de eugenol e limoneno estão apresentados na Tabela 15.

Tabela 15. Concentração bactericida mínima (CBM) de eugenol e limoneno para *Listeria monocytogenes* Scott A (Lm Scott A), *L. monocytogenes* ATCC 35152 (Lm ATCC 35152), *L. monocytogenes* sorovar 1/2c (Lm 1/2c), *L. monocytogenes* sorovar 1/2a (Lm 1/2a), *L. monocytogenes* sorovar 4b (Lm 4b) e *L. monocytogenes* isolado de carcaça de frango (Lm f)

Composto ativo	Micro-organismos avaliados (CIM em %)					
	Lm Scott A	Lm ATCC35152	Lm 1/2c	Lm 1/2a	Lm 4b	Lm f
Eugenol	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025
Limoneno	0,05	0,05	0,1	0,1	0,1	0,1

De maneira geral, observou-se que as cepas de referência *L. monocytogenes* Scott A e *L. monocytogenes* ATCC 35152 foram mais sensíveis aos eugenol e limoneno quando comparados com os isolados de alimentos (*L. monocytogenes* 1/2c, *L. monocytogenes* 1/2a e *L. monocytogenes* f) e o isolado clínico (*L. monocytogenes* 4b).

A Tabela 16 apresenta os valores da população em log UFC/mL de *L. monocytogenes* Scott A, *L. monocytogenes* ATCC 35152, *L. monocytogenes* 1/2c, *L. monocytogenes* 1/2a, *L. monocytogenes* 4b e *L. monocytogenes* f, para cada ensaio definido pelo planejamento experimental.

Tabela 16. População de *L. monocytogenes* (log UFC/mL), após 24h a 37° C, obtida a partir das combinações definidas pelo Delineamento Composto Central Rotacional 2²

Ensaio	População de <i>L. monocytogenes</i> (log UFC/mL)					
	Lm Scott A	Lm ATCC 35152	Lm 1/2c	Lm 1/2a	Lm 4b	Lm f
1	8,5 ± 0,17	8,5 ± 0,11	8,5 ± 0,10	8,3 ± 0,11	8,5 ± 0,11	8,5 ± 0,11
2	8,4 ± 0,11	8,4 ± 0,11	8,4 ± 0,13	8,2 ± 0,11	8,2 ± 0,13	8,4 ± 0,15
3	8,5 ± 0,13	8,5 ± 0,12	8,5 ± 0,11	8,5 ± 0,11	8,6 ± 0,11	8,3 ± 0,12
4	--- *	--- *	--- *	--- *	--- *	--- *
5	8,4 ± 0,11	8,4 ± 0,12	8,4 ± 0,14	8,4 ± 0,11	8,3 ± 0,11	8,3 ± 0,11
6	2,4 ± 0,21	2,4 ± 0,13	3,4 ± 0,21	3,1 ± 0,11	3,1 ± 0,19	3,4 ± 0,21
7	6,5 ± 0,17	6,4 ± 0,11	6,5 ± 0,22	6,4 ± 0,11	6,5 ± 0,14	6,6 ± 0,26
8	2,6 ± 0,14	2,6 ± 0,18	3,6 ± 0,14	3,6 ± 0,11	3,6 ± 0,20	3,6 ± 0,18
9	2,5 ± 0,14	2,5 ± 0,15	3,5 ± 0,12	3,5 ± 0,14	3,5 ± 0,13	3,5 ± 0,12
10	2,4 ± 0,16	2,5 ± 0,16	3,4 ± 0,11	3,4 ± 0,13	3,5 ± 0,12	3,3 ± 0,11
11	2,5 ± 0,16	2,5 ± 0,13	3,3 ± 0,11	3,5 ± 0,11	3,3 ± 0,11	3,3 ± 0,11

*Não houve crescimento dos isolados na maior diluição estudada pela metodologia empregada.

A Tabela 17 apresenta um resumo dos principais fatores avaliados: equação modelo, coeficiente de determinação (R^2), F-tabelado e F-calculado.

Tabela 17. Modelo final para a população (P) de *Listeria monocytogenes* avaliado em função da concentração de eugenol (E) e limoneno (L) adicionada na formulação do filme de alginato

<i>Listeria monocytogenes</i>	Modelo para a população de <i>L. monocytogenes</i> (log UFC/mL)	R^2	F _{tab}	F _{calc}
Lm Scott A	$P = 2,46 - 2,12E + 1,82E^2 - 1,76L + 1,38L^2 - 2,10ExL$	0,95	5,05	20,55
Lm ATCC	$P = 2,47 - 2,11E + 1,81E^2 - 1,76L + 1,37L^2 - 2,08ExL$	0,94	5,05	19,6
Lm 1/2c	$P = 3,41 - 1,94E + 1,47E^2 - 1,58L + 1,03L^2 - 2,10ExL$	0,95	5,05	19,17
Lm 1/2a	$P = 3,44 - 1,94E + 1,37E^2 - 1,58L + 1,00L^2 - 2,10ExL$	0,95	5,05	19,69
Lm 4b	$P = 3,42 - 1,93E + 1,36E^2 - 1,62L + 1,04L^2 - 2,06ExL$	0,94	5,05	17,14
Lm f	$P = 3,35 - 1,93E + 1,46E^2 - 1,57L + 1,07L^2 - 2,05ExL$	0,95	5,05	20,87

Para a avaliação da influência dos fatores estudados sobre a resposta, foram considerados significativos os parâmetros com p-valores menores que 5% ($p < 0,05$). Os fatores que não apresentaram efeitos significativos foram incorporados aos resíduos para o cálculo da ANOVA e obtenção dos valores do coeficiente de determinação R^2 e F-calculado. As tabelas de ANOVA e os gráficos de valores experimentais *versus* valores previstos para os modelos apresentados na Tabela 17 encontram-se no ANEXO 2 (Tabela 29, Tabela 30, Tabela 32, Tabela 33, Tabela 35, Tabela 36, Tabela 38, Tabela 39, Tabela 41, Tabela 42, Tabela 44, Tabela 45). Observou-se que, independente da cepa avaliada, a falta de ajuste (Lack of Fit) do modelo não foi significativa, ou seja, o modelo encontra-se bem ajustado e é capaz de explicar os dados

obtidos. Além disso, o coeficiente de determinação R^2 mostrou que 95% da variação observada no ensaio estão incorporadas na regressão obtida pelo modelo e apenas 5% é proveniente do erro aleatório.

Todos os modelos que representam a população de *L. monocytogenes* em função da combinação de eugenol e limoneno apresentaram termos quadráticos significativos ($p < 0,05$), justificando, portanto, a escolha do planejamento central composto rotacional como modelo quadrático para o sistema estudado.

De uma maneira geral, observou-se que quando os valores dos coeficientes da regressão (Tabela 17) são avaliados, o maior efeito na redução da população de *L. monocytogenes* é verificado quando a combinação binária entre eugenol e limoneno é utilizada comparado ao uso individual dessas substâncias, confirmando, portanto, a existência de sinergismo entre esses dois compostos.

A representação gráfica das equações obtidas a partir dos modelos apresentados na Tabela 17 podem ser visualizadas nas curvas de contorno apresentadas na Figura 4. Observa-se que, independente da cepa avaliada, a combinação entre eugenol e limoneno nos pontos centrais promoveu uma redução de aproximadamente 4 log UFC/mL na população de *L. monocytogenes*, o que concorda com os resultados obtidos experimentalmente e que estão representados nas condições 9, 10 e 11 na Tabela 16. Observa-se também que o aumento na redução da população de *L. monocytogenes* ocorre conforme o fator 1 (eugenol) e o fator 2 (limoneno), concomitantemente, se aproximam do nível +1,41, ou seja, na faixa máxima onde estes dois compostos são combinados encontra-se a maior redução da população de *L. monocytogenes*.

Figura 4. Curvas de contorno para a variável resposta população de *L. monocytogenes* (log UFC/mL) (A) *L. monocytogenes* Scott A, (B) *L. monocytogenes* ATCC, (C) *L. monocytogenes* 1/2c, (D) *L. monocytogenes* 1/2a, (E) *L. monocytogenes* 4b e (F) *L. monocytogenes* f em função da concentração de Eugenol (%) e Limoneno (%)

Por outro lado, quando o fator 1 (eugenol) e o fator 2 (limoneno) são avaliados individualmente, observa-se que não há redução na população de *L. monocytogenes* no nível máximo avaliado. Esse resultado já era esperado, pois o limite máximo (+1,41) estabelecido para o planejamento experimental correspondeu à metade da CIM obtida para o composto ativo avaliado.

Os valores referentes à validação dos modelos encontram-se nas tabelas apresentadas no ANEXO 2 (Tabela 31, Tabela 34, Tabela 37, Tabela 40, Tabela 43, Tabela 46), no qual foi observado que os maiores desvios relativos estão relacionados aos modelos que apresentaram menores valores para o coeficiente de determinação.

4.4 AVALIAÇÃO DO SINERGISMO DOS COMPOSTOS ATIVOS PRESENTES NO OE DE CRAVO E OE DE LIMÃO CONTRA *Pseudomonas* spp e *Salmonella* spp

A inclusão de *Pseudomonas* spp no presente projeto de pesquisa é justificada pela relação do micro-organismo com o processo de deterioração de embutidos cárneos. Optou-se também pela inclusão de *Salmonella* spp para verificar o espectro da atividade antimicrobiana de eugenol e limoneno contra um micro-organismo patogênico Gram-negativo.

A partir dos valores da CIM (Tabela 18) encontrados para eugenol e limoneno contra *Pseudomonas* spp e *Salmonella* spp, foi elaborado o planejamento experimental conforme apresentado na Tabela 5.

Tabela 18. Concentração inibitória mínima (CIM) de eugenol e limoneno para *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella* Give e *Salmonella* Enteritidis

Composto ativo	Micro-organismos avaliados (CIM em %)				
	<i>P.fluorescens</i>	<i>P.putida</i>	<i>P.aeruginosa</i>	<i>S. Give</i>	<i>S. Enteritidis</i>
Eugenol	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
Limoneno	0,8	0,8	0,6	0,8	0,8

Comparando os valores da CIM encontrados para *Pseudomonas* spp e *Salmonella* spp com os valores encontrados para *L. monocytogenes*, observou-se que a concentração de eugenol e limoneno necessária para inibir esses micro-organismos foi oito vezes e dezesseis vezes superior, respectivamente.

Os maiores valores da CIM encontrados para os micro-organismos Gram-negativos concordam com os resultados descritos em literatura. Inúmeros trabalhos que avaliaram o modo de ação de OE e seus compostos ativos contra micro-organismos patogênicos e deteriorantes verificaram que, em geral, as bactérias Gram-positivas foram mais sensíveis aos compostos antimicrobianos quando comparadas às bactérias Gram-negativas (OUTTARA *et al.*, 1997; SMITH-PALMER, STEWART e FYFE, 1998; JULIANO, MATTANA e USAI, 2000; MARINO, BERSANI e COMI, 2001; HARPAZ *et al.*, 2003; ROHANI *et al.*, 2011; FEI *et al.*, 2011; AIT-OUAZZOU *et al.*, 2012; TURGIS *et al.*, 2012). A maior resistência dos micro-organismos Gram-negativos está relacionada com a presença de uma membrana externa formada por uma bicamada lipídica envolvendo a parede celular desses micro-organismos que dificulta a difusão dos compostos ativos presentes em OE (BURT, 2004).

A Tabela 19 apresenta os valores da população em log UFC/mL de *P. fluorescens*, *P. putida* e *P. aeruginosa* ATCC 27853 para cada ensaio definido pelo planejamento experimental e a Tabela 20 apresenta os valores da população em log UFC/mL de *S. Give* e *S. Enteritidis*.

Tabela 19. População de *Pseudomonas* spp (log UFC/mL), **após 24h a 37°C**, obtida a partir das combinações definidas pelo Delineamento Composto Central Rotacional 2²

Ensaio	População de <i>Pseudomonas</i> spp (log UFC/mL)		
	<i>P.fluorescens</i>	<i>P.putida</i>	<i>P.aeruginosa</i> ATCC27853
1	9,4 ± 0,2	9,1 ± 0,2	9,0 ± 0,2
2	9,2 ± 0,1	9,0 ± 0,1	8,8 ± 0,1
3	9,0 ± 0,1	9,0 ± 0,1	8,8 ± 0,2
4	--- *	--- *	--- *
5	8,2 ± 0,2	8,5 ± 0,2	8,1 ± 0,2
6	3,1 ± 0,2	3,3 ± 0,2	3,0 ± 0,2
7	5,5 ± 0,1	5,7 ± 0,1	5,1 ± 0,1
8	3,4 ± 0,2	3,0 ± 0,2	3,0 ± 0,2
9	3,5 ± 0,2	3,1 ± 0,2	2,9 ± 0,2
10	3,3 ± 0,2	3,2 ± 0,2	3,1 ± 0,2
11	3,2 ± 0,2	3,0 ± 0,2	3,1 ± 0,2

*Não houve crescimento dos isolados na maior diluição estudada pela metodologia empregada.

Tabela 20. População de *Salmonella* spp (log UFC/mL), **após 24h a 37°C**, obtida a partir das combinações definidas pelo Delineamento Composto Central Rotacional 2²

Ensaio	População de <i>Salmonella</i> spp (log UFC/mL)	
	S. Give	S. Enteritidis
1	9,3 ± 0,2	9,2 ± 0,2
2	9,1 ± 0,1	9,1 ± 0,1
3	9,0 ± 0,1	9,1 ± 0,1
4	6,2 ± 0,2	6,6 ± 0,1
5	9,2 ± 0,2	9,2 ± 0,2
6	6,1 ± 0,2	6,3 ± 0,2
7	9,1 ± 0,1	9,1 ± 0,1
8	6,2 ± 0,2	6,1 ± 0,2
9	6,2 ± 0,1	6,2 ± 0,2
10	6,4 ± 0,2	6,3 ± 0,2
11	6,2 ± 0,2	6,1 ± 0,2

As tabelas de ANOVA para os modelos apresentados na Tabela 19 encontram-se no ANEXO 2 (Tabela 47, Tabela 48, Tabela 50, Tabela 51, Tabela 53, Tabela 54). De uma maneira geral, observou-se que a interação binária entre eugenol e limoneno promoveu uma maior redução da população de *Pseudomonas* spp comparado ao uso individual desses compostos, confirmando a existência de sinergismo entre eugenol e limoneno. Foi observada a ausência de multiplicação de *Pseudomonas* spp no ensaio 4 (0,15% eugenol e 0,30% limoneno), demonstrando que o uso combinado

desses dois compostos em concentrações reduzidas é tão efetivo quanto seu uso individual estabelecido pela concentração inibitória mínima. No entanto, para *Salmonella* spp o mesmo efeito não foi observado.

Por outro lado, observa-se que apesar de a combinação de eugenol e limoneno não resultarem numa ação bactericida contra *Salmonella* spp, a combinação desses dois compostos em concentrações reduzidas promoveu um efeito bacteriostático sobre o micro-organismo conforme os valores apresentado na Tabela 20. Contudo, não foi possível apresentar um modelo que descrevesse esse comportamento, pois tanto para *S. Give* como para *S. Enteridis* a falta de ajuste do modelo (*Lack of Fit*) foi significativa ($p < 0,05$). As tabelas de ANOVA estão apresentadas no ANEXO 2 (Tabela 56, Tabela 57, Tabela 58, Tabela 59).

A Tabela 21 apresenta um resumo dos principais fatores avaliados para *Pseudomonas* spp: equação modelo, coeficiente de determinação (R^2), F-tabelado e F-calculado.

Tabela 21. Modelo final para a população (P) de *Pseudomonas* spp avaliado em função da concentração de eugenol (E) e limoneno (L) adicionada na formulação do filme de alginato

<i>Pseudomonas</i> spp	Modelo para a população de <i>Pseudomonas</i> spp (log UFC/mL)	R^2	F _{tab}	F _{calc}
<i>P.fluorescens</i>	$P = 3,33 - 2,10E + 1,62E^2 - 1,52L + 1,02L^2 - 2,20ExL$	0,89	5,05	7,25
<i>P.putida</i>	$P = 3,10 - 2,06E + 1,81E^2 - 1,61L + 1,03L^2 - 2,22ExL$	0,91	5,05	10,12
<i>P.aeruginosa</i>	$P = 3,03 - 2,02E + 1,72E^2 - 1,49L + 0,97L^2 - 2,15ExL$	0,88	5,05	7,40

Apesar dos coeficientes de determinação para os modelos apresentados para *Pseudomonas* spp serem menores quando comparado aos coeficientes de determinação dos modelos apresentados para *L. monocytogenes*, o modelo encontra-se com um bom ajuste e é capaz de explicar os dados obtidos. Os gráficos de valores experimentais *versus* valores previstos para os modelos apresentados na Tabela 21 encontram-se no ANEXO 2 (Figura 19, Figura 20, Figura 21) e a representação gráfica dos modelos estão representadas pelas curvas de contorno na Figura 5.

Assim como as curvas de contorno obtidas a partir do modelo que determinou a população de *L. monocytogenes* em função das concentrações de eugenol e limoneno, o mesmo comportamento foi observado para os modelos que representaram o comportamento de *Pseudomonas* spp frente a esses mesmos compostos. Independentemente da cepa avaliada, conforme o fator 1 (eugenol) e o fator 2 (limoneno) se aproximam da faixa máxima na qual estes dois compostos são combinados, encontra-se a maior redução da população de *Pseudomonas* spp.

Figura 5. Curvas de contorno para a variável resposta população de *Pseudomonas* spp (log UFC/mL) (A) *P. fluorescens*, (B) *P. putida* e (C) *P. aeruginosa* em função da concentração de Eugenol (%) e Limoneno (%)

4.4.1 CARACTERIZAÇÃO DO FILME ANTIMICROBIANO À BASE DE ALGINATO

4.4.1.1 Atividade antimicrobiana *in vitro* dos filmes contra *Listeria monocytogenes* e *Pseudomonas* spp

Para a avaliação da atividade antimicrobiana *in vitro* dos filmes à base de alginato incorporados com eugenol e limoneno optou-se por avaliar somente o efeito antimicrobiano contra *L. monocytogenes* e *Pseudomonas* spp, uma vez que a combinação de eugenol e limoneno nas concentrações estudadas não promoveu o efeito inibitório contra *Salmonella* spp em meio de cultura.

A partir de ensaios preliminares, observou-se que a adição de eugenol e limoneno na melhor condição encontrada em meio de cultura (ensaio 4 – 0,01% eugenol e 0,04% limoneno) não foi suficiente para gerar uma zona de inibição contra *L. monocytogenes* quando estes compostos foram adicionados à formulação do filme à base de alginato. Dessa maneira, concentrações mais elevadas dos compostos foram avaliadas, conforme apresentado na Tabela 22.

As concentrações de eugenol (0,04%) e limoneno (0,16%) incorporadas à formulação do filme à base de alginato necessária para promover o aparecimento de uma zona de inibição antimicrobiana foram quatro vezes superiores aos valores encontrados em meio de cultura. Concentrações de eugenol e limoneno proporcionais às encontradas na determinação da CIM (Tabela 15) destes compostos também foram adicionadas à formulação do filme e os resultados da zona de inibição antimicrobiana estão apresentados na Tabela 22.

Com o objetivo de verificar quais etapas do processo de elaboração dos filmes à base de alginato poderiam influenciar na atividade antimicrobiana dos compostos ativos, a medida da zona de inibição em mm² dos filmes foi avaliada antes e após a etapa de *crosslinking* complementar com o cloreto de

cálcio. O teste de Tukey, considerando o intervalo de confiança de 95%, foi realizado para a verificação da existência de diferenças significativas entre as duas etapas avaliadas.

Tabela 22. Atividade antimicrobiana dos filmes avaliada pela medida da zona de inibição em mm² para as etapas antes (I) e após o *crosslinking* complementar com cloreto de cálcio (II) referente aos ensaios contendo a combinação de eugenol a 0,04% e limoneno 0,16%, ensaio contendo eugenol a 0,1% e ensaio contendo limoneno a 0,4%.

Ensaio		Crosslinking	<i>Listeria monocytogenes</i> (Zona de Inibição em mm ²)					
Eugenol (%)	Limoneno (%)		Lm Scott A	Lm ATCC35152	Lm 1/2c	Lm 1/2a	Lm 4b	Lm f
0,04	0,16	I	96,0±3,1 ^a	86,3±2,0 ^a	84,7±2,5 ^a	83,9±2,4 ^a	86,6±2,7 ^a	87,4±3,1 ^a
		II	71,2±3,7 ^b	64,2±4,1 ^b	63,1±3,2 ^b	65,2±2,8 ^b	64,3±3,2 ^b	63,2±3,3 ^b
0,1	0,0	I	86,3±2,7 ^a	72,1±2,5 ^a	76,3±2,0 ^a	77,3±2,4 ^a	76,1±2,0 ^a	78,3±2,5 ^a
		II	58,7±4,7 ^b	50,2±2,4 ^b	50,2±3,8 ^b	53,1±2,7 ^b	52,7±3,0 ^b	54,2±3,3 ^b
0,0	0,4	I	71,0±3,5 ^a	67,2±2,3 ^a	66,2±2,2 ^a	65,2±2,5 ^a	65,4±2,4 ^a	66,0±3,0 ^a
		II	52,1±2,1 ^b	50,1±1,5 ^b	51,2±1,8 ^b	51,2±1,7 ^b	50,1±1,6 ^b	52,1±2,5 ^b

L. monocytogenes Scott A (*Lm Scott A*), *L. monocytogenes* ATCC 35152 (*Lm ATCC35152*), *L. monocytogenes* sorovar 1/2c (*Lm 1/2c*), *L. monocytogenes* sorovar 1/2a (*Lm 1/2a*), *L. monocytogenes* sorovar 4b (*Lm 4b*) e *L. monocytogenes* isolado de carcaça de frango (*Lm f*)

Média ± desvio padrão (n=5) na mesma coluna para um mesmo ensaio seguida por letras iguais não diferem estatisticamente entre si para o nível de significância de 5%.

Os resultados indicam que a diminuição da atividade antimicrobiana do filme está relacionada com a etapa de *crosslinking* complementar, sugerindo que parte dos compostos ativos incorporados ao filme é volatilizada durante o processo de secagem ou solubilizada durante essa etapa. No entanto, sabendo que a etapa complementar de *crosslinking* com CaCl_2 é necessária para a manutenção da estrutura do filme quando este for aplicado em alimento, este procedimento será mantido.

A Figura 6 apresenta o detalhe da zona de inibição antimicrobiana do filme à base de alginato contendo a combinação de 0,04% de eugenol e 0,16% de limoneno contra *Listeria monocytogenes*.

Figura 6. Zona de inibição antimicrobiana do filme de alginato contendo 0,04% de eugenol e 0,16% de limoneno

Na Figura 7 encontra-se a comparação entre os valores da zona de inibição antimicrobiana correspondentes à etapa de *crosslinking* complementar para os diferentes sorovares de *L. monocytogenes* avaliadas neste estudo.

Figura 7. Zona de inibição antimicrobiana (mm²) contra *Listeria monocytogenes* para os ensaios contendo a combinação de 0,04% eugenol e 0,16% limoneno, ensaio contendo 0,1% eugenol e ensaio contendo 0,4% limoneno

Assim como observado para os ensaios *in vitro*, a combinação de eugenol e limoneno em concentrações reduzidas propiciou um efeito antimicrobiano significativamente maior ($p < 0,05$) quando comparado ao uso individual desses compostos incorporados à formulação do filme à base de alginato.

Em função da comprovação *in vitro* do sinergismo entre eugenol e limoneno contra *Pseudomonas* spp, as combinações encontradas foram incorporadas à formulação do filme à base de alginato e a avaliação da atividade antimicrobiana pela medida da zona de inibição em mm² foi realizada conforme apresentado na Tabela 23. Ao contrário do observado para *L. monocytogenes*, as concentrações de eugenol (0,3%) e limoneno (0,6%) necessárias para promover o aparecimento de uma zona de inibição antimicrobiana contra *Pseudomonas* spp foi duas vezes superior ao melhor valor encontrado *in vitro* (ensaio 4 – 0,15% eugenol e 0,3% limoneno).

Tabela 23. Atividade antimicrobiana dos filmes contra *Pseudomonas fluorescens* (Pf), *P. putida* (Pp) e *P. aeruginosa* ATCC 27853 (PaATCC) avaliada pela medida da zona de inibição em mm² referente aos ensaios contendo a combinação de 0,15% eugenol e 0,30% limoneno e 0,30% eugenol e 0,60% limoneno

Ensaio		<i>Pseudomonas</i> spp (Zona de Inibição em mm ²)		
Eugenol (%)	Limoneno (%)	Pf	Pp	PaATCC
0,15	0,30	0,0	0,0	0,0
0,30	0,60	47,1±2,5	45,2±2,3	42,1±3,4

Como efeito de comparação, os resultados da medida da zona de inibição contra *L. monocytogenes* utilizando as mesmas concentrações estabelecidas para *Pseudomonas* spp foram realizados e estão apresentados na Tabela 24.

Tabela 24. Atividade antimicrobiana dos filmes contra *Listeria monocytogenes* Scott A (Lm Scott A), *L. monocytogenes* ATCC 35152 (Lm ATCC35152), *L. monocytogenes* sorovar 1/2c (Lm 1/2c), *L. monocytogenes* sorovar 1/2a (Lm 1/2a), *L. monocytogenes* sorovar 4b (Lm 4b) e *L. monocytogenes* isolado de carcaça de frango (Lm f) avaliada pela medida da zona de inibição em mm² referente aos ensaios contendo a combinação de 0,15% eugenol e 0,30% limoneno e 0,30% eugenol e 0,60% limoneno

Ensaio		<i>Listeria monocytogenes</i> (Zona de Inibição em mm ²)					
Eugenol (%)	Limoneno (%)	Lm Scott A	Lm ATCC35152	Lm 1/2c	Lm 1/2a	Lm 4b	Lm f
0,15	0,3	82,3±3,7 ^a	85,2±4,1 ^a	85,1±3,1 ^a	83,3±3,8 ^a	84,0±2,5 ^a	84,1±3,2 ^a
0,3	0,6	89,1±2,7 ^a	89,2±3,4 ^a	90,2±3,8 ^a	88,1±1,8 ^a	87,0±2,4 ^a	88,2±1,2 ^a

Média ± desvio padrão (n=5) na mesma coluna para um mesmo ensaio seguida por letras iguais não diferem estatisticamente entre si para o nível de significância de 5%.

A partir dos resultados obtidos, observou-se que a combinação de 0,3% de eugenol e 0,6% de limoneno apresentou ação antimicrobiana tanto para *Pseudomonas* spp como para diferentes sorovares de *L. monocytogenes*.

Apesar da medida da zona de inibição antimicrobiana fornecer um indicativo da eficiência antimicrobiana do composto estudado, observou-se que apesar do aumento na concentração de eugenol e limoneno incorporados à matriz do filme, não houve diferença significativa ($p < 0,05$) para os valores

de zona de inibição antimicrobiana para o ensaio contendo 0,15% de eugenol e 0,3% de limoneno e para o ensaio contendo 0,3% de eugenol e 0,6% de limoneno (Figura 8). Estes resultados ressaltam a importância de validar os resultados encontrados *in vitro* em ensaios *in situ*.

Figura 8. Zona de inibição antimicrobiana (mm²) contra *Listeria monocytogenes* para os ensaios contendo a combinação de 0,04% eugenol e 0,16% limoneno, ensaio contendo 0,1% eugenol e ensaio contendo 0,4% imoneno

4.4.1.2 Propriedades Mecânicas

Na Tabela 25 estão apresentados os valores de resistência máxima à tração e da elongação na ruptura para os ensaios que apresentaram os maiores valores de zona de inibição antimicrobiana conforme apresentado no item 4.4.1.1.

Tabela 25. Valores de resistência máxima à tração ($R_{m\acute{a}x}$) e alongamento na ruptura (%) referente aos ensaios contendo a combinação de 0,04% eugenol e 0,16% limoneno, 0,15% eugenol e 0,3% limoneno e ensaio contendo 0,30% eugenol e 0,60% limoneno adicionados à formulação do filme à base de alginato

Ensaio		$R_{m\acute{a}x}$ (MPa)	Alongamento na ruptura (%)
Eugenol (%)	Limoneno (%)		
0,04	0,16	$64,03 \pm 4,35^a$	$11,10 \pm 1,36^b$
0,15	0,30	$52,56 \pm 5,02^b$	$21,02 \pm 1,42^a$
0,30	0,60	$55,12 \pm 4,62^b$	$22,60 \pm 1,60^a$

T=25±2°C, UR=75%

Média ± desvio padrão na mesma coluna seguida pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si para o nível de significância de 5%.

Observou-se que para todas as combinações avaliadas, apenas o ensaio contendo 0,04% de eugenol e 0,16% de limoneno apresentou resistência máxima à tração significativamente maior ($p < 0,05$) e alongamento na ruptura significativamente menor ($p < 0,05$) comparado às demais combinações estudadas.

Os resultados obtidos nesse estudo corroboram com o relatado por Benavides *et al.* (2012) que avaliaram o efeito da incorporação de óleo essencial de orégano nas propriedades mecânicas de filmes à base de alginato de cálcio. Estes autores relataram que a incorporação de óleos essenciais na solução filmogênica interfere nas ligações iônicas entre o alginato e os íons de cálcio, reduzindo a forças intermoleculares ao longo da cadeia polimérica e aumentando, portanto, sua mobilidade. Dessa forma, os filmes contendo maiores concentrações de óleos essenciais e/ou outros agentes plastificantes, apresentam valores menores de resistência máxima à tração e maiores valores de alongamento na ruptura.

Em geral, os filmes à base de alginato de cálcio são mais rígidos e possuem valores de resistência máxima à tração superiores aos filmes à base

de gelatina (ARVANITOYANNIS *et al.*, 1998; AHMAD *et al.* 2012; BERGO *et al.* 2013), filmes à base de proteína isolada de soja (CARPINE *et al.*, 2015; CHAO *et al.*, 2010; GUERRERO *et al.*, 2011) e filmes à base de amido (SOUZA, 2012; GARCIA *et al.*, 2004; WILHELM *et al.* 2013).

4.4.1.3 Propriedades de Barreira

A Tabela 26 apresenta os valores de permeabilidade ao vapor de água para os ensaios que apresentaram os maiores valores de zona de inibição antimicrobiana conforme apresentado no item 4.4.1.1.

Tabela 26. Valores de permeabilidade ao vapor de água referente aos ensaios contendo a combinação de 0,04% eugenol e 0,16% limoneno, 0,15% eugenol e 0,3% limoneno e ensaio contendo 0,30% eugenol e 0,60% limoneno adicionados à formulação do filme à base de alginato

Ensaio		PVA
Eugenol (%)	Limoneno (%)	(g.m.m ⁻² .s ⁻¹ .Pa ⁻¹)x10 ⁻¹¹
0,04	0,16	0,54±0,08 ^b
0,15	0,30	1,74±0,11 ^a
0,30	0,60	1,80±0,13 ^a

T=25±2°C, UR=75%

Média ± desvio padrão na mesma coluna seguida pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si para o nível de significância de 5%.

Os valores de permeabilidade ao vapor de água encontrados neste estudo foram inferiores ao relatado por Benavides *et al.* (2012) e Olivas e Barbosa-Cánovas (2008) que encontraram valores na ordem de 10⁻⁹ (g.m.m⁻².s⁻¹.Pa⁻¹) e 10⁻¹⁰ (g.m.m⁻².s⁻¹.Pa⁻¹), respectivamente. No entanto, estes autores trabalharam com concentrações de agentes plastificantes incorporados à solução filmogênica maiores do que a utilizada neste estudo. Além disso, neste estudo foi adotado a etapa de *crosslinking* complementar com CaCl₂ que contribuiu para a diminuição da permeabilidade ao vapor de água.

A Tabela 27 apresenta os valores do coeficiente de permeabilidade ao oxigênio.

Tabela 27. Coeficiente de permeabilidade ao oxigênio ($P'O_2$) dos filmes à base de alginato contendo a combinação de 0,04% eugenol e 0,16% limoneno, 0,15% eugenol e 0,3% limoneno e ensaio contendo 0,30% eugenol e 0,60% limoneno

Ensaio		$P'O_2$
Eugenol (%)	Limoneno (%)	$(\text{cm}^3 \cdot \text{m}^{-1} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{Pa}^{-1}) \times 10^{-11}$
0,04	0,16	$2,02 \pm 0,38^a$
0,15	0,30	$2,51 \pm 0,21^a$
0,30	0,60	$2,32 \pm 0,23^a$

$T=25 \pm 2^\circ\text{C}$, UR=75%

Média $\pm$ desvio padrão na mesma coluna seguida pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si para o nível de significância de 5%.

Os resultados de $P'O_2$ obtidos no presente estudo são menores aos valores encontrados por Mali *et al.* (2004), que encontrou valores de $P'O_2$ na ordem de $10^{-10} \text{ cm}^3 \cdot \text{m}^{-1} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{Pa}^{-1}$ para filmes à base de amido de batata, porém, maiores do que o relatado por Souza *et al.* (2012) que relatou valores na ordem de $10^{-13} \text{ cm}^3 \cdot \text{m}^{-1} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{Pa}^{-1}$ para filmes à base de amido adicionado de silicato de argila.

4.4.1.4 Atividade de água

A média dos valores de atividade de água do filme à base de alginato foi $0,45 \pm 0,02$ independente da formulação avaliada. Observou-se que após serem aplicados no salame e decorridos os 30 dias de armazenagem à 7°C , os filmes apresentaram um aumento significativo ($p < 0,05$) na atividade de água cuja média foi $0,55 \pm 0,02$.

Os valores de atividade de água do filme à base de alginato encontrados nesse estudo foram menores aos relatados por Igarashi (2010), que observou um aumento na atividade de água de 0,47 para 0,76 após os filmes ficarem em contato com a carne de frango *in natura* por 5 dias à 7°C . O aumento da atividade de água dos filmes foi justificado pelo exsudamento de água do frango para a embalagem.

O menor valor de atividade de água encontrado nesse estudo após a aplicação do filme no alimento é justificado pelo menor valor de atividade de

água do salame ($a_w=0,88$) comparado à carne de frango *in natura* ($a_w=0,99$) e por esta matriz não sofrer exsudação.

4.4.1.5 Avaliação da disponibilidade dos compostos ativos incorporados no filme de alginato

A proposta inicial para a quantificação e identificação dos compostos ativos presentes incorporados no filme à base de alginato seria a utilização da técnica de cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massa (CG/MS), com auxílio da equipe do Laboratório de Lípidos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCF-USP). No entanto, apesar das diferentes condições de trabalho avaliadas (taxa de fluxo do gás de arraste, temperatura da linha de transferência, taxa de injeção da alíquota de amostra avaliada e voltagem da ionização) e das diferentes colunas avaliadas (coluna HP-1MS composição: 100% dimetilpolisiloxano e coluna HP-5MS composição: 5% fenil e 95% dimetilpolisiloxano) não foi possível a identificação precisa dos compostos.

Como alternativa à técnica de CG/MS, foi proposta a avaliação da disponibilidade dos compostos ativos incorporados ao filme pela determinação dos compostos fenólicos totais utilizando a técnica de Folin Ciocalteu, conforme modificações na metodologia proposta por Oussalah *et al.* (2007). Nessa técnica, não é possível discriminar as frações de eugenol e limoneno separadamente e o resultado é expresso como concentração de compostos fenólicos estimado em mg de ácido gálico. Como os compostos responsáveis pela ação bactericida do óleo essencial é um composto fenólico, optamos por usar essa metodologia. Os resultados estão apresentados na Tabela 28.

Tabela 28. Concentração dos compostos fenólicos totais presentes no filme à base de alginato incorporados com eugenol e limoneno analisados em diferentes períodos de armazenamento

Ensaio		Fenólicos Totais - ác. gálico equivalente (mg/L)						
Eugenol (%)	Limoneno (%)	Dia 1	Dia 3	Dia 5	Dia 7	Dia 10	Dia 15	Dia 30
0,15	0,30	96,9±2,3 ^a	84,2±2,3 ^a	72,1±2,3 ^b	68,9±2,2 ^b	< 50	< 50	< 50
0,30	0,60	168,9±2,2 ^a	160,2±2,0 ^a	150,1±3,0 ^a	120,12±2,1 ^b	98,2±2,8 ^c	65,2±2,7 ^d	< 50

Média ± desvio padrão (n=2) na mesma linha seguida pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si para o nível de significância de 5%.

A partir da determinação dos compostos fenólicos totais é possível observar uma queda significativa a partir do 5º dia na concentração destes compostos ao longo do período de armazenagem. A relação entre a determinação dos compostos fenólicos totais e a atividade antimicrobiana dos filmes incorporados com eugenol e limoneno estão apresentados no item 4.4.2.

4.4.2 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS FILMES EM CONTATO COM SALAME FATIADO

A avaliação da atividade antimicrobiana dos filmes em contato com salame fatiado foi realizada somente com as formulações referentes aos ensaios contendo 0,15% de eugenol e 0,3% de limoneno e 0,3% de eugenol e 0,6% de limoneno. Estas formulações foram escolhidas por apresentarem os maiores valores de zona de inibição avaliados *in vitro*. Os resultados referentes à enumeração de *L. monocytogenes* no primeiro dia de análise, após 10, 20 e 30 dias de armazenamento a 7º C estão apresentados na Figura 9.

Figura 9. Comportamento de *L. monocytogenes* (log UFC.g⁻¹) em salame fatiado coberto com o filme antimicrobiano contendo (—●—) 0,15% eugenol e 0,3% limoneno, (—●—) 0,3% eugenol e 0,6% limoneno e (—●—) sem o filme – controle – após 0, 10, 20 e 30 dias de armazenamento a 7°C.

Apesar da medida da zona de inibição antimicrobiana (mm²) indicar que não houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre os ensaios contendo 0,15% de eugenol e 0,3% de limoneno e o ensaio contendo 0,3% de eugenol e 0,6% de limoneno (item 4.4.1.1, Tabela 24), em ensaios realizados *in situ*, utilizando salame fatiado e o filme como embalagem primária, o mesmo comportamento não foi observado.

Enquanto o filme contendo 0,15% de eugenol e 0,3% de limoneno promoveu o controle da multiplicação de *L. monocytogenes* em amostras de salame fatiado até o 30º dia de armazenamento a 7°C, a utilização do filme antimicrobiano contendo 0,3% de eugenol e 0,6% de limoneno promoveu a redução de 2 log UFC/g da população de *L. monocytogenes* até o 10º dia de

análise permanecendo posteriormente constante até o 30º dia. Por outro lado, a amostra controle apresentou um aumento significativo de 4 log UFC/g na população do patógeno após 30 dias de armazenamento à 7°C.

Oussalah *et al.* (2007a) relataram que a incorporação de diferentes concentrações de cloreto de cálcio como agente *crosslinking* e a adição de óleos essenciais na concentração de 1% em formulação de filme à base de alginato promoveu o controle na população de *L. monocytogenes* inoculada em amostras de presunto, enquanto a amostra controle apresentou um aumento significativo de 1 log UFC/cm² na população do patógeno após 5 dias de armazenamento à 4°C.

Millette *et al.* (2007) e Oussalah *et al.* (2006a) também observaram o efeito bacteriostático da utilização de filmes à base de alginato incorporados com antimicrobianos naturais em matrizes alimentares à base de carne. Outros estudos que avaliaram o efeito antimicrobiano de filmes à base de alginato apenas utilizaram ensaios *in vitro*, avaliando a zona de inibição antimicrobiana (CHA *et al.*, 2002; MAIZURA *et al.*, 2007; PRANOTO, SALOKHE e RAKSHIT, 2005).

A Figura 10 apresenta a comparação entre o teor de fenólicos totais e o comportamento de *L. monocytogenes* nas amostras de salame fatiado no qual as formulações contendo 0,15% de eugenol e 0,3% de limoneno e, 0,3% de eugenol e 0,6% de limoneno foram utilizados.

Observou-se que na formulação do filme contendo 0,15% de eugenol e 0,3% de limoneno a quantificação dos compostos fenólicos totais ficou abaixo do limite de detecção do método após 10 dias de armazenamento, sendo que este ensaio correspondeu ao efeito bacteriostático contra *L. monocytogenes*. Já o ensaio contendo 0,3% de eugenol e 0,6% de limoneno incorporados à formulação do filme, a quantificação dos compostos fenólicos totais foi significativamente maior ($p < 0,05$) desde o primeiro dia até o 20º dia de armazenamento do filme antimicrobiano.

Figura 10. Comparação entre o teor de fenólicos totais expressos em mg.L⁻¹ ác. gálico equivalente e o comportamento de *L. monocytogenes* (log UFC.g⁻¹) em salame fatiado coberto com o filme antimicrobiano contendo (a) 0,15% eugenol e 0,3% limoneno, e (b) 0,3% eugenol e 0,6% limoneno ao longo do período de armazenamento a 7°C

Estes resultados sugerem que há correlação entre o teor de compostos fenólicos totais e o comportamento de *L. monocytogenes* em amostras de salame fatiado cobertas com o filme à base de alginato incorporados com eugenol e limoneno.

4.4.3 ANÁLISE SENSORIAL

Os resultados referentes às opiniões dos 35 provadores com relação ao sabor, aroma e aparência das amostras de salame fatiado encontram-se na Figura 11 e Figura 12, respectivamente.

Figura 11. Aceitabilidade das amostras de salame fatiado com relação ao sabor e aroma.

As notas médias atribuídas pelos 35 provadores para o sabor e aroma das amostras de salame nas quais foram utilizadas o filme à base de alginato incorporado com 0,3% de eugenol e 0,6% de limoneno (filme A), 0,15% de eugenol e 0,3% de limoneno (filme B) e na amostra padrão (sem o filme) foram 7,0, 7,3 e 7,6, respectivamente. Os resultados obtidos sugerem que não houve uma preferência significativa ($p < 0,05$) independente da amostra avaliada pelo provador.

Considerando apenas a aceitabilidade das amostras, que compreende a faixa entre “gostei ligeiramente” a “gostei extremamente”, os resultados apresentados na Figura 11 mostram que foram aceitas pelos provadores tanto a amostra na qual o filme A (85,7%) foi utilizado, como a amostra na qual o filme B (88,6%) foi utilizado como separador de fatia. Já a amostra

padrão apresentou uma aceitabilidade de 92,1%. Entre esses provadores, 28,6% (10) relataram nos comentários que notaram uma pequena diferença no sabor das amostras, porém, esse fato não prejudicou a nota final de avaliação. Em geral, estes provadores julgaram as três amostras com notas semelhantes.

Tantos os 8,6% (3) que rejeitaram o sabor e aroma da amostra com o filme A como os 5,7% (2) que rejeitaram a amostra com o filme B não indicaram nos comentários os motivos da rejeição. Observou-se que esses provadores foram mais críticos também na avaliação da amostra controle, cuja nota máxima atribuída correspondeu à escala "gostei regularmente".

Dos 35 provadores, apenas 8,6% (3) indicaram nos comentários que sentiram diferença no aroma das amostras. Para esses provadores, tanto o filme A como o filme B utilizados como separador de fatia reduziram o aroma característico das amostras de salame, quando comparado à amostra controle.

Com relação à aparência das amostras, as notas médias atribuídas pelos provadores foram 6,8 e 7,5 para as amostras de salame nas quais o filme A e B foram utilizados como separador de fatia, e, 7,4 para a amostra controle. A opinião dos provadores com relação à aceitabilidade das amostras de salame fatiado considerando a aparência está apresentada na Figura 12.

Figura 12. Aceitabilidade das amostras de salame fatiado com relação à aparência.

Apesar da nota média atribuída para a amostra na qual o filme A foi utilizado como separador ser significativamente menor ($p < 0,05$) quando comparado com as demais amostras avaliadas pelos provadores, verificou-se que a porcentagem de provadores que atribuíram notas dentro da escala de aceitação “gostei ligeiramente” a “gostei extremamente” foi semelhante para as três amostras avaliadas. Os resultados apresentados na Figura 12 indicam que 88,6% (31), 94,3% (33) e 88,6% (31) dos provadores aceitaram a aparência das amostras de salame na qual o filme A, filme B e amostra padrão sem o filme, respectivamente, foram utilizados.

Com relação à rejeição das amostras, 5,7% (2) dos provadores rejeitaram a aparência das amostras com o filme A e a amostra padrão. A amostra na qual o filme B foi utilizado como separador de fatia não apresentou rejeição. Comparando esses resultados com os comentários relatados pelos provadores, concluiu-se que a rejeição não estava relacionada com as possíveis características que o contato do filme com o salame poderia conferir ao produto, mas sim com atributos aleatórios. Entre os comentários descritos pelos provadores estão a presença de pontos pretos relacionados aos condimentos utilizados no preparo do embutido, a diferença na distribuição da gordura pela massa, amostra com marcas, sendo estas possivelmente relacionadas ao vácuo aplicado na embalagem, entre outros.

5 CONCLUSÃO

Baseados nas condições desta pesquisa e nos resultados e discussão apresentados, pode-se concluir que:

- há sinergismo entre os compostos ativos eugenol e limoneno contra *L. monocytogenes* e *Pseudomonas* spp., mas não para *Salmonella* spp. nos ensaios *in vitro*
- as propriedades mecânicas e de barreira do filme à base de alginato não foram significativamente afetadas pelas concentrações de eugenol e limoneno avaliadas neste estudo
- apesar da zona de inibição antimicrobiana (mm²) fornecer um indicativo *in vitro* da eficiência antimicrobiana do filme, estes resultados devem ser validados em ensaios realizados *in situ*
- há correlação entre o teor de compostos fenólicos totais e o comportamento de *L. monocytogenes* em amostras de salame fatiado cobertas com o filme à base de alginato incorporados com eugenol e limoneno
- o sabor, o aroma e a aparência das amostras de salame cobertas com o filme contendo 0,15% de eugenol e 0,30% de limoneno e, 0,3% de eugenol e 0,6% de limoneno foram aceitos pelos provadores que participaram da análise sensorial

As informações disponibilizadas neste estudo mostram que o filme à base de alginato incorporado com 0,3% de eugenol e 0,6% de limoneno mostrou-se promissor na sua aplicação como embalagem antimicrobiana para o controle de *L. monocytogenes* em salame fatiado. No entanto, essa aplicação depende da produção de materiais mais estáveis às condições de armazenamento e do desenvolvimento de tecnologia de produção desses filmes em escala industrial.

6 REFERÊNCIAS

- AHMAD, M.; BENJAKUL, S.; PRODPRAN, T.; AUGUSTINI, T. Physico-mechanical and antimicrobial properties of gelatin film from the skin of unicorn leatherjacket incorporated with essential oils. **Food Hydrocolloids**, v.28, n.1, p.189-199.
- AHMED, O.M.; PANGLOLI, P.; HWANG, C.A.; ZIVANOVIC, S.; WU, T.; D'SOUZA, D.; DRAUGHON, F.A. The occurrence of *Listeria monocytogenes* in retail ready-to-eat meat and poultry products related to the levels of acetate and lactate in the products. **Food Control**, v.52, p.43-48, 2015.
- AIT-OUAZZOU, A.; ESPINA, L.; CHERRAT, L.; HASSANI, M.; LAGLAOUI, A.; CONCHELLO, P.; PAGÁN, R. Synergistic combination of essential oils from Morocco and physical treatments for microbial inactivation. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 16, p. 283-290, 2012
- ALSHEIKH, A.D.I.; MOHAMMED, G.E.; ABDALLA, M.A. Isolation and Identification of *Listeria monocytogenes* from Retail Broiler Chicken Ready to Eat Meat Products in Sudan. **International Journal of Animal and Veterinary Advances**, v.5, n.1, p.9-14, 2013.
- AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. D882-10: **Standard Test Methods of tensile properties of thin plastic sheeting**. Philadelphia, 2010.
- AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. E96/E96-10: **Standard Test Methods of water vapor transmission of materials**. Philadelphia, 2010.
- AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. F1927-07: **Standard Test Methods for determination of oxygen gas transmission rate, permeability and permeance at controlled relative humidity through barrier materials using a coulometric detector**. Philadelphia, 2007.
- ANGELIDIS, A.S., KOUTSOUMANIS, L. Prevalence and concentration of *Listeria monocytogenes* in sliced ready-to-eat meat products in the Hellenic retail market. **Journal of Food Protection**, v.69, n.4, p.938-942, 2006.
- ANONYMOUS, 2003. Microbiological challenge testing. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, Chapter VI. 2S, p. 46-50, 2003.

- ARAUJO, P.C.C.; FRANCO, R.M.; OLIVEIRA, L.A.T.; CARVALHO, J.C.A.P. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in turkey's meat products commercialized in Niteroi – Brazil. **Acta Scientiae Veterinariae**, n. 30, v. 1, p. 19-25, 2002.
- ARNAUT-ROLLIER I.; DE ZUTTER, L.; VAN HOOF, J. Identities of the *Pseudomonas* spp. in flora from chilled chicken. **International Journal of Food Microbiology**, v. 48 p. 87–96, 1999.
- ARVANITOYANNIS, I., NAKAYAMA, A., AIBA, S. Chitosan and gelatin based edible films: State diagrams, mechanical and permeation properties. **Carbohydrate Polymers**, v.37, p.371–382. 1998
- ASLAM, M.; SERVICE, C. Genetic characterization of spoilage pseudomonads isolated from retail-displayed beef. **Letters in Applied Microbiology**, v. 47, p. 153–157, 2008.
- AZEREDO, H.M.C.; MATTOSO, L.H.C.; WOOD, D.; WILLIAMS, T.G.; AVENNABUSTILLOS, R. J.; MCHUGH, T. H. Nanocomposite edible films from mango puree reinforced with cellulose nanofibers. **Journal of Food Science**, v. 74, n. 5, p. 31-35, 2009.
- BENAVIDES, S.; Villalobos-Carvajal, R.; Reyes, J.E. Physical, mechanical and antibacterial properties of alginate film: Effect of the crosslinking degree and oregano essential oil concentration. **Journal of Food Engineering**, v.110 p.232–239, 2012.
- BERGO, P.; MORAES, I.C.F.; SOBRAL, P.J.A. . Effects of plasticizer concentration and type on moisture content in gelatin films. **Food Hydrocolloids**, v. 32, p. 412-415, 2013.
- BERSOT, L.S.; GILLIO, C.; TAVOLARO, P.; LANDGRAF, M.; FRANCO, B.G.M.; DESTRO, M.T. Behaviour of *Listeria monocytogenes* in sliced, vacuum-packaged mortadella. **Brazilian Journal of Food Microbiology**, v.39, p.514-516, 2008.
- BEVERLYA, R. L.; JANESA, M. E.; PRINYAWIWATKULAA, W.; NOB, H. K. Edible chitosan films on ready-to-eat roast beef for the control of *Listeria monocytogenes*. **Food Microbiology**, v. 25, p.534-537, 2008.
- BIRK-UROVITZ, E. The 2008 Canadian listeriosis outbreak: a result of knowledge ignored. **McMaster University Medical Journal**, v.8, n.1, p.65-67, 2011.
- BORGES, M.F.; SIQUEIRA, R.S.; BITTENCOURT, A.M.; VANETTI, M.C.D.; GOMIDE, L. A. M. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in salami. **Revista de Microbiologia**, n. 30, v. 4, p. 362-364. 1999.

- BRACCINI, I; PÉREZ, S. Molecular Basis of Ca^{2+} - Induced Gelation in Alginates and Pectins: The Egg-Box Model Revisited. **Biomacromolecules**, v. 2, p. 1089-1096, 2001.
- BRAVIN, B.; PERESSINI, D.; SENSIDONI, A. Development and application of polysaccharide-lipid edible coating to extend shelf life of dry bakery products. **Journal of Food Engineering**, v. 76, p. 280-290, 2006.
- BURT, S. A. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, p. 223-253, 2004.
- BURT, S. A.; REINDERS, R. D. Antibacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* O157:H7. **Letters in Applied Microbiology**, v. 36, p. 162-167, 2003.
- CARPINÉ, D.; DAGOSTIN, J.L.A.; BERTAN, L.C.; MAFRA, M.R. Development and Characterization of Soy Protein Isolate Emulsion-Based Edible Films with Added Coconut Oil for Olive Oil Packaging: Barrier, Mechanical, and Thermal Properties. *Food and Bioprocess Technology*, v.8, n.8, p.1811-1823, 2015.
- CEYLAN, E.; FUNG, D. Y. C. Antimicrobial activity of spices. **Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology**, v. 12, n. 1, p. 1-55, 2004.
- CHA, D. S.; CHINNAN, M. S. Biopolymer-Based Antimicrobial Packaging: A Review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 44, p. 223-237, 2004.
- CHA, D. S.; CHOI, J. H.; CHINNAN, M. S.; PARK, H. J. Antimicrobial Films Based on Na-alginate and k-carrageenan. **Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie**, v. 35, p. 715-719, 2002.
- CHAND, S.; LUZUNZI, I.; VEAL, D. A.; WILLIAMS, L. R.; KARUSO, P. Rapid screening of the antimicrobial activity of extracts and natural products. **Journal of Antibiotics**, v. 47, p. 1295-1304, 1994.
- CHAO, Z.; YUE, M., XIAOYAN, Z.; DAN M. Development of soybean protein-isolate edible films incorporated with beeswax, Span 20, and glycerol. **Journal of Food Science**, v.75, n.6, p. C493-497, 2010.
- CHIARINI, E. ***Listeria monocytogenes* em matadouros de aves: marcadores sorológicos e genéticos no monitoramento de sua disseminação**. São Paulo, 2007. 140p. Tese de Doutorado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Universidade de São Paulo.
- CI, S. X.; HUYNH, T. H.; LOUIE, L. W.; YANG, A.; BEALS, B. J.; RON, N.; TSANG, W.; SOON-SHIONG, P.; DESAI, N. P. Molecular mass

- distribution of sodium alginate by high-performance size-exclusion. **Journal of Chromatography**, v. 864, n. 2, p. 199-210, 1999.
- DATTA, S.; JANES, M. E.; XUE, Q. G.; LOSSO, J.; LA PEYRE, J.F. Control of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* Anatum on the Surface of Smoked Salmon Coated with Calcium Alginate Coating containing Oyster Lysozyme and Nisin. **Journal of Food Science**, v. 73, n. 2, p. M67-M71, 2008.
- DE VALK, H., VAILLANT, V., JACQUET, C., ROCOURT, J., LE QUERREC, F., STAINER, F., QUELQUEJEU, N., PIERRE, O., PIERRE, V., DESENCLOS, J.-C., GOULET, V. Two consecutive nationwide outbreaks of listeriosis in France, October 1999-February 2000. **American Journal of Epidemiology**, v.154, p.944-950, 2001.
- DEBEAUFORT, F; QUEZADA-GALLO, J. A.; VOILLEY, A. Edible Films and Coatings: Tomorrow's Packaging: a Review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 38, n. 4, p. 299-313, 1998.
- DELAUNE, E., SOKOL, T., RATARD, R., ALLEN, L., KISSLER, B., SEYS, S.. Outbreak of invasive listeriosis associated with the consumption of hog head cheese – Louisiana, 2010. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v.60, n.13, p.401-405, 2011.
- DEVI, K.P.; NISHA, S.A.; SAKTHIVEL, R.; PANDIAN, S.K. Eugenol (an essential oil of clove) acts as an antibacterial agent against *Salmonella* Typhi by disrupting the cellular membrane. **Journal of Ethnopharmacology**, v.130, n.1, p.107-115, 2010.
- DI PINTO, A., NOVELLO, L., MONTEMURRO, F., BONERBA, E., TANTILLO, G. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods from supermarkets in Southern Italy. **New Microbiologica**, v.33, p.249-252, 2010.
- DIAS, D.A.M. **Persistência de cepas de *Listeria monocytogenes* em linha de abate industrial de frango em um matadouro localizado no Estado de São Paulo**. São Paulo, 2008. 66p. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Universidade de São Paulo
- DIMITRIJEVIC, S. I.; MIHAJLOVSKI, K.R.; ANTONOVIC, D.G.; MILANOVICSTEVANOVIC, M.R.; MIJIN, D. Z. A study of the synergistic antilisterial effects of a sub-lethal dose of lactic acid and essential oils from *Thymus vulgaris* L., *Rosmarinus officinalis* L. and *Origanum vulgare* L. **Food Chemistry**, n. 104, p. 774-782, 2007.
- DOULGERAKI, A.I.; ERCOLINI, D.; VILLANI, F.; NYCHAS, G-J. E. Spoilage microbiota associated to the storage of raw meat in different conditions.

International Journal of Food Microbiology, v. 157, n. 2, p. 130–141, 2012.

DU, W. X.; OLSEN, C. W.; AVENA-BUSTILLOS, R. J.; MCHUGH, T. H.; LEVIN, C. E.; FRIEDMAN, M. Storage Stability and Antibacterial Activity against *Escherichia coli* O157:H7 of Carvacrol in Edible Apple Films Made by Two Different Casting Methods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 3082–3088, 2008.

ERTESVAG, Helga; VALLA, Svein. Biosynthesis and applications of alginates. **Polymer Degradation and Stability**, v.59, p.85-91, 1998.

FALGUERA, V; QUINTERO, J.P.; JIMENEZ, A.; MUNOZ; J.A; IBARZ, A. Edible films and coatings: structures, active functions and trends in their use. **Trends in Food Science & Technology**, v. 22, p. 292-303, 2011.

FAN, Y.; XUA, Y.; WANG, D; SUN, L. Z. J.; SUN, L; ZHANG, B. Effect of alginate coating combined with yeast antagonist on strawberry (*Fragaria × ananassa*) preservation quality. **Postharvest Biology and Technology**, v. 53, n. 1-2, p. 84-90, 2009.

FARBER, J.M.; COATES, F.; DALEY, E. Minimum water activity requirements for the growth of *Listeria monocytogenes*. **Letters in Applied Microbiology**, v.15, n.3, p.103-105, 1992

FARBER, J.M.; PETERKIN, P.I. *Listeria monocytogenes*, a foodborne pathogen. *Microbiology Review*, v.55, n.3, p.476-511, 1991.

FDA. **Guidance for Industry: Use of Recycled Plastics in Food Packaging: Chemistry Considerations**. 2006. Disponível em: <<http://www.fda.gov/Food/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/GuidanceDocuments/FoodIngredientsandPackaging/ucm120762.htm>>. Acesso em: 20 de Novembro de 2013.

FEI, L.; YI-CHENG, D.; XING-QIAN; Y.; YU-TING, D. Antibacterial effect of cinnamon oil combined with thyme or clove oil. **Agricultural Sciences in China**, v. 10, n. 9, p. 1482-1487, 2011.

FISHER, K.; PHILLIPS, C. A. The effect of lemon, orange and bergamot essential oils and their components on the survival of *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus* *in vitro* and in food systems. **Journal of Applied Microbiology**, v. 10, p. 1232-1240, 2006.

FORSYTHE, Stephen J. *Microbiologia da Segurança Alimentar*. Porto Alegre: Artmed, 2005.

FRYE, D.M., ZWEIG, R., STURGEON, J., TORMEY, M., LECAVALIER, M., LEE, I., LAWANI, L. AND MASCOLA, L. An outbreak of febrile gastroenteritis

- associated with delicatessen meat contaminated with *Listeria monocytogenes*. **Clinical Infectious Disease**, v.35, p.943-949, 2002.
- GACESA, Peter. Alginates. **Carbohydrate Polymers**, v.8, p.161-182, 1988.
- GARCIA, M.A.; PINOTTI, A.; MARTINO, M.N.; ZARITZKY, N. Characterization of composite hydrocolloid film. **Carbohydrate Polymers**, v.56, p.339-345, 2004.
- GARRIDO, V., VITAS, A.I., GARCIA-JALÓN, I. Survey of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat products: prevalence by brands and retail establishments for exposure assessment of listeriosis in Northern Spain. **Food Control**, v.20, p.986-991, 2009.
- GELBÍČOVÁ, T.; KARPÍŠKOVÁ, R. Occurrence and Characteristics of *Listeria monocytogenes* in Ready-to-eat Food from Retail Market in the Czech Republic. **Czech Journal of Food Science**, v.27, n.2, p.S2-3-S2-7, 2009
- GIANFRANCESCHI, M., GATTUSO, A., FIORE, A., D'OTTAVIO, M.C., CASALE, M., PALUMBO, A., AURELI, P. Survival of *Listeria monocytogenes* in uncooked Italian dry sausage (salami). **Journal of Food Protection**, v.69, n.7, p.1533-1538, 2006.
- GIL, A.O.; HOLLEY, R.A. Disruption of *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Lactobacillus sakei* cellular membranes by plant oil aromatics. **International Journal of Food Microbiology**, v.108, n.1, p.1-9, 2006.
- GOLDFINE, H.; SHEN, H. *Listeria monocytogenes*: pathogenesis and host response. Springer, 2007.
- GOMBAS, D.E.; CHEN, Y.; CLAVERO, R.S.; SCOTT, V.N. Survey of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. **Journal of Food Protection**, v.66, n.4, p.559-269, 2003.
- GOTTLIEB, S.L., NEWBERN, E.C., GRIFFIN, P.M., GRAVES, L.M., HOEKSTRA, R.M., BAKER, N.L. Multistate outbreak of listeriosis linked to turkey deli meat and subsequent changes in US regulatory policy. **Clinical Infectious Diseases**, v.42, p.29-36, 2006.
- GRANT, G. T.; MORRIS, E. R.; REES, D. A.; SMITH, P. J. C.; THOM, D. Biological interactions between polysaccharides and divalent cations: the egg-box model. **FEBS Letters**, v.32, n.1, p. 195-198, 1973.
- GUERRERO, P., HANANI, Z. A. N., KERRY, J. P., DE LA CABA, K. Characterization of soy protein-based films prepared with acids and oils by compression. **Journal of Food Engineering**, v.107, n.1, p.41-49, 2011.

- HAMMER, K. A.; CARSON, C. F.; RILEY, T. V. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. **Journal of Applied Microbiology**, n. 86, p. 985-990, 1999.
- HARPAZ, S.; GLATMAN, L.; DRABKIN, V.; GELMAN, A. Effects of herbal essential oils used to extend the shelf life of freshwater-reared Asia sea bass fish (*Lates calcarifer*). **Journal of Food Protection**, v. 66, n. 3, p. 307-312, 2003.
- HITCHINS, A.D. *Listeria monocytogenes*. In: UNITED STATES. Food and Drug Administration. Center for Food Safety and Applied Nutrition. **Bacteriological Analytical Manual online**. 2003. Cap. 10. Disponível em: <http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/UCM071400>. Acesso em: 15 de Fevereiro de 2014.
- HOFFMANN, F.L.; GARCIA-CRUZ, C.H.; VINTURIM, T.M. Estudo higiênico – sanitário preliminar de amostras de salame. **Higiene Alimentar**, v. 11, n. 47, p. 42 – 44, 1997.
- IGARASHI, M.C. **Desenvolvimento de filme comestível à base de alginato incorporado do agente antimicrobiano óleo essencial de cravo: aplicação em alimento**. São Paulo, 2010. 94p. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Universidade de São Paulo.
- JACQUET, C.; GOUIN, E.; JEANNEL, D.; COSSART, P.; ROCOURT, J. Expression of ActA, Ami, IntB and listeriolysin O in *Listeria monocytogenes* of human and food origin. **Applied Environmental Microbiology**, v.68, n.2, p.616-622, 2002.
- JAYASEKARA, R.; HARDING, I.; BOWATER, I.; LONERGAN, G. Biodegradability of Selected Range os Polymers and Polymer Blends and Standart Methods for Assessment os Biodegradation. **Journal of Polymer and the Environment**, v. 13, n. 03, p. 231-251, 2005.
- JEMMI, T.; STEPHAN, R. *Listeria monocytogenes*: food-borne pathogen and hygiene indicator. **Revue Scientifique Et Technique**, v.25, n.2, p.571-580, 2006.
- JULIANO, C.; MATTANA, A.; USAI, M. Composition and *in vitro* antimicrobial activity of the essential oil of *Thymus herba-barona* Loisel growing wild in Sardinia. **Journal of Essential Oil Research**, v. 12, p. 516-522, 2000.
- KESTER, J. J.; FENNEMA, O. R. Edible films and coatings: a review. **Food Technology**, v. 40, n. 12, p. 47-59, 1986.

- LOBO V.M.; UGALDE, M.G.; FRIES, L.L.M.; KUBOTA, E.H. Avaliação microbiológica de salames coloniais comercializados no município de Santa Maria – RS. **Higiene Alimentar**, v. 15, n. 88, p. 57 – 61, 2001.
- LU F.; LIU D. H.; YE X. Q; WEI, Y.; LIU, F. Alginate–calcium coating incorporating nisin and EDTA maintains the quality of fresh northern snakehead (*Channa argus*) fillets stored at 4° C. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 89, n. 5, p. 848-854, 2009
- MAGNANI, A.L.; GIOMBELLI, A.; SHUCK, M.S.; BUSATO, M.A.; SILVA, N.L. Incidência de *Salmonella* e *Escherichia coli* em carne suína in natura e salame colonial, consumidos pela população de Chapecó – SC. **Higiene Alimentar**, v. 14, n. 73, p. 44 – 47, 2000.
- MAIZURA, M.; FAZILAH, A.; NORZIAH, M. H.; KARIM, A. A. Antibacterial activity and mechanical properties of partially hydrolyzed sago-starch-alginate edible film containing lemongrass oil. **Journal of Food Science**, v. 72, n. 6, 2007.
- MALI, S.; GROSSMANN M.V.E.; GARCIA, M.A.; MARTINO, M.N.; ZARISTSKY, N.E. Barrier, mechanical and optical properties of plasticized yam starch films. *Carbohydrate Polymers*, v.56, p.129-135, 2004.
- MANN, C. M.; MARKHAM, J. L. A new method for determining the minimum inhibitory concentration of essential oils. **Journal of Applied Microbiology**, v. 84, n. 3, p. 538-544, 1998.
- MARINO, M.; BERSANI, C.; COMI, G. Impedance measurements to study the antimicrobial activity of essential oils from *Laminacea* and *Compositae*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 67, p. 187-195, 2001.
- MARTINS, E. A.; GERMANO, P. M. L. *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat, sliced, cooked ham and salami products marketed in the city of São Paulo, Brazil: occurrence, quantification and serotyping. **Food Control**, n. 22, p. 291-302, 2011.
- MELDRUM, R.J., ELLIS, P.W., MANNION, P.T., HALSTEAD, D., GARSIDE, J. Prevalence of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods sampled from the point of sale in Wales, United Kingdom. **Journal of Food Protection**, v.73, n.8, p.1515–1518, 2010.
- MELONI, D.; CONSOLATI, S.G.; MAZZA, R.; MUREDDU, A.; FOIS, F.; PIRAS, F.; MAZZETTE, R. Presence and molecular characterization of the major serovars of *Listeria monocytogenes* in ten Sardinian fermented sausage processing plants. **Meat Science**, v.97, p.443–450, 2014

MILLETTE, M., TIEN, C. L.; SMORAGIEWICZ, W.; LACROIX, M. Inhibition of *Staphylococcus aureus* on beef by nisin-containing modified alginate films and beads. **Food Control**, v. 18, p. 878-884, 2007.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA. **Artigo no 412 do Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal**. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Aniamal/MercadoInterno/Requisitos/RegulamentoInspecaoIndustrial.pdf>. Acesso em 10 de Janeiro de 2013.

NATIONAL STARCH FOOD INNOVATION. **Purity gum Be – Technical Service Bulletin**. Disponível em: <<http://eu.foodinnovation.com/docs/PGUMBE.pdf>>. Acesso em: 24 de Novembro de 2013.

NEW ZEALAND PUBLIC HEALTH SURVEILLANCE REPORT. **December 2012: Covering July to September 2012, v.10, n.4. Acesso em 28 de Junho de 2015**. Disponível em: <https://surv.esr.cri.nz/PDF_surveillance/NZPHSR/2012/NZPHSR2012Dec.pdf>

NGUEFACKA, J.; TAMGUEA, O.; LEKAGNE, J.B.; DONGMOA, DAKOLEA, C.D.; LETH, V.; VISMERC, H.F.; AMVAM-ZOLLOA, P.H. Synergistic action between fractions of essential oils from *Cymbopogon citratus*, *Ocimum gratissimum* and *Thymus vulgaris* against *Penicillium expansum*. **Food Control**, n. 23, p. 377-383, 2012.

NIELSEN, D.S.; JACOBSEN, T.; JESPERSEN, L.; KOCH, A.G.; ARNEBORG, N. Occurrence and growth of yeasts in processed meat products – Implications for potential spoilage. *Meat Science*, v. 80, n. 3, p. 919-926, 2008.

NSW Food Authority. 2009. **Microbiological quality of packaged ready-to-eat meat products..** Disponível em: <<http://www.foodauthority.nsw.gov.au/science/marketanalysis/>> Acesso em 01 de Abril de 2015

NSW FOOD AUTHORITY. **Foodwise – a NSW Food authority newsletter for NSW food industries**, v.16, p.7. Disponível em: <http://www.foodauthority.nsw.gov.au/_Documents/industry_pdf/Foodwise_Spring_2009.pdf> Acesso em 01 de Julho de 2015.

NYCHAS, G-J. E.; SKANDAMIS, P.N.; TASSOU, C.C.; KOUTSOUMANIS, K.P. Meat spoilage during distribution. **Meat Science**, v. 78, n. 1-2, p. 77-89, 2008.

- OLIVAS, G. I.; MATTINSON, D.S.; BARBOSA-CÁNOVAS, G. V. Alginate coatings for preservation of minimally processed 'Gala' apples. **Postharvest Biology and Technology**, v. 45, n. 1, p. 89-96, 2007.
- OLIVAS, G.I; BARBOSA-CÁNOVAS, G.V. Alginate-calcium films: Water vapor permeability and mechanical properties as affected by plasticizer and relative humidity. **LWT – Food Science and Technology**, v.41, p.359-366, 2008.
- OLSEN, S.J., PATRICK, M., HUNTER, S.B., REDDY, V., KORNSTEIN, L., MACKENZIE, W.R., LANE, D., BIDOL, S., STOLTMAN, G.A., FRYE, D.M., LEE, I., HURD, S., JONES, T.F., LAPORTE, T.N., DEWITT, W., GRAVES, L., WIEDMANN, M., SCHOONMAKER-BOPP, D.J., HUANG, A.J., VINCENT, C., BUGENHAGEN, A., CORBY, J., CARLONI, E.R., HOLCOMB, M.E., WORON, R.F., ZANSKY, S.M., DOWDLE, G., SMITH, F., AHRABI-FARD, S., ONG, A.R., TUCKER, N., HYNES, N.A. AND MEAD, P. Multistate outbreak of *Listeria monocytogenes* infection linked to delicatessen turkey meat. **Clinical Infectious Disease**, v.40, p.962-967, 2005.
- OUATTARA, B.; SIMARD, R. E.; HOLLEY, R. A.; PIETTE, G. J. Antibacterial activity of selected fatty acids and essential oils against six meat spoilage organisms. **International Journal of Food Microbiology**, v. 37, p. 155-162, 1997.
- OUSSALAH, M.; CAILLET, S.; SALMIÉRI, S.; SAUCIER, L.; LACROIX, M. Antimicrobial Effects of Alginate Based Film Containing Essential oils for the Preservation of Whole Beef Muscle. **Journal of Food Protection**, v. 69, n. 10, p. 2364-2369, 2006a.
- OUSSALAH, M.; CAILLET, S.; SALMIÉRI, S.; SAUCIER, L.; LACROIX, M. Antimicrobial effects of alginate-based films containing essential oils on *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* Typhimurium present in bologna and ham. **Journal of Food Protection**, v. 20, n. 4, p. 961-908, 2007b.
- OUSSALAH, M.; CAILLET, S.; SAUCIER, L.; LACROIX, M. Antimicrobial effects of selected plant essential oils on the growth of a *Pseudomonas putida* strain isolated from meat. **Meat Science**, v. 73, p. 236-244, 2006b.
- OUSSALAH, M.; CAILLET, S.; SAUCIER, L.; LACROIX, M. Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. **Food Control**, v. 18, p. 414-420, 2007a.
- PAVLATH, A. E.; GOSSETT, C.; CAMIRAND, W.; ROBERTSON, G. H. Ionomeric Films of Alginic Acid. **Journal of Food Science**, v. 64, n. 1, 1999.
- PETRUZZELLI, A., BLASI, G., MASINI, L., CALZA, L., DURANTI, A., SANTARELLI, S., FISICHELLA, S., PEZZOTTI, G., AQUILANTI, L., OSIMANI, A., TONUCCI, F. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in

- salami manufactured in the Marche Region (Central Italy). **Journal of Veterinary Medical Science**, v.72, n.4, p.499-502, 2010.
- PRANOTO, Y.; SALOKHE, V. M.; RAKSHIT, S. Physical and antibacterial properties of alginate-based edible film incorporated with garlic oil. **Food Research International**, v. 38, p. 267-272, 2005.
- RATTANACHAIKUNSOPON, P.; PHUMKHACKORN, P. In vitro study of synergistic antimicrobial effect of carvacrol and cymene on drug resistant *Salmonella* Thyphi. **African Journal of Microbiology Research**, v.3, p.978-980, 2009.
- RAYBAUDI-MASSILIA, R. M.; MOSQUEDA-MELGAR, J.; MARTIN-BELLOSO, O. Edible alginate-based coating as carrier of antimicrobials to improve shelf-life and safety of fresh-cut melon. **International Journal of Food Microbiology**, v. 121, p. 313-327, 2008.
- RHIM, J. W. Physical and mechanical properties of water resistant sodium alginate films. **Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie**, v. 37, p. 323-330, 2004.
- RITTER, R.; SANTOS, D.; AGOSTINI, F.S.; CARBONI, A.R.; BERGMANN, G.P. Microbiologia contaminante e patogênica de lingüiça (salame) colonial, analisada em quatro períodos distintos. **Higiene Alimentar**, v. 17, n. 113, p. 60 – 66, 2003
- RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos**. 1 ed. Casa do Pão Editora, cap. 3, p. 123, 2005.
- ROHANI, S.M.R.; MORADI, M.; MEHDIZADEH, T.; SAEI-DEHKORDI, S.S.; GRIFFITHS, M. The effect of nisin and garlic (*Allium sativum* L.) essential oil separately and in combination on the growth of *Listeria monocytogenes*. **LWT - Food Science and Technology**, v. 44, p. 2260-2265, 2011.
- ROJAS-GRAÜ, M. A.; AVENA-BUSTILLOS, R. J.; OLSEN, C.; FRIEDMAN, M.; HENIKA, P. R.; MARTÍN-BELLOSO, O.; PAN, Z.; MCHUGH, T. H. Effects of plant essential oils and oil compounds on mechanical , barrier and antimicrobial properties of alginate-apple puree edible films. **Journal of Food Engineering**, v. 81, p. 634-641, 2007a.
- ROJAS-GRAÜ, M. A.; RAYBAUDI-MASSILIA, R. M.; SOLIVA-FORTUNY R. C.; AVENA-BUSTILLOS, R. J.; MCHUGH, T. H; MARTÍN-BELLOSO, O. Apple puree-alginate edible coating as carrier of antimicrobial agents to prolong shelf-life of fresh-cut apples. **Postharvest Biology and Technology**, v. 45, n. 2, p. 254-264, 2007b.

- SAKATE, R.I.; ARAGON, L.C.; RAGHIANTE, F.; LANDGRAF, M.; FRANCO, B. D.G.M.; DESTRO, M.T. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in presliced vacuum-packaged salami in Sao Paulo – Brazil. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v. 53, n. 2, p. 184-187, 2003
- SAUDERS, B.; DURAK, M.; FORTES, E.; WINDHAM, K.; SCHUKKEN, Y.; LEMBO, A.; AKEY, B.; NIGHTINGALE, K.; WIEDMANN, M. Molecular characterization of *Listeria monocytogenes* from natural and urban environments. **Journal of Food Protection**, v.19, n.1, p.93-105, 2006.
- SEBTI, I.; CHOLLET, E.; DEGRAEVE, P.; NOEL, C.; PEYROL, E. Water Sensitivity, Antimicrobial, and Physicochemical Analyses of Edible Films Based on HPMC and/or Chitosan. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 693-399, 2007.
- SEYDIM, A. C.; SARIKUS, G. Antimicrobial activity of whey protein based edible films incorporated with oregano, rosemary and garlic essential oils. **Food Research International**, v. 39, n. 5, p. 639-644, 2006.
- SIKKEMA, J.; DE BONT, J. A. M.; POOLMAN, B. Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 11, p. 8022-8028, 1994.
- SIM, J., HOOD, D., FINNIE, L., WILSON, M., GRAHAM, C., BRETT, M. AND HUDSON, J.A. Series of incidents of *Listeria monocytogenes* non-invasive febrile gastroenteritis involving ready-to-eat meats. **Letters Applied Microbiology**, v.35, p.409-413, 2002.
- SMITH-PALMER, A.; STEWART, J.; FYFE, L. Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. **Letters in Food Microbiology**, v. 29, p. 118-122, 1998.
- SORRENTINO, A.; GORRASI, G.; VITTORIA, V. Potencial perspectives of bionanocomposites for food packaging applications. **Trends in Food Science and Technology**, v. 18; n. 84-95, 2007.
- SOUZA, A.C.; BENZE, R.; FERRÃO, E.S.; DITCHFIELD, C.; COELHO, A.C.V.; TADINI, C.C. Cassava starch biodegradable films: influence of glycerol and clay nanoparticles content on tensile and barrier properties and glass transition temperature. **LWT – Food Science and Technology**, v.46, p.110-117, 2012.
- SUPPAKUL, P.; MILTS, J.; SONNEVELD, K.; BIGGER, S.W. Active packaging technologies with emphasis on antimicrobial packaging and its applications. **Journal of Food Science**, v.68, p.408-420, 2003.
- THEIVENDRAN, S.; HETTIARACHCHY, N. S.; JOHNSON, M. G. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by Nisin Combined with Grape Seed Extract or

- Green Tea Extract in Soy Protein Film Coated on Turkey Frankfurters. **Journal of Food Science**, v. 71, n. 2, p. M39-M44, 2006.
- TOMPKIN, R. B. Control of *Listeria monocytogenes* in the food-processing environment. **Journal of Food Protection**, n. 65, v. 4, p. 709-725, 2002.
- TURGIS, M.; HAN, J.; CAILLET, S.; LACROIX, M. Antimicrobial activity of mustard essential oil against *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* Typhi. **Food Control**, n. 20, p. 1073-1079, 2009.
- TURGIS, M.; VU, K.D.; DUPONT, C.; LACROIX, M. Combined antimicrobial effect of essential oils and bacteriocins against foodborne pathogens and food spoilage bacteria. **Food Research International**, v. 48, p. 696-702, 2012
- USEPA. **Green engineering for a sustainable environment**. 2011. Disponível em: < <http://www.epa.gov/oppt/greenengineering/>>. Acesso em: 12 de Janeiro de 2013.
- VALERO, M.; FRANCES, E. Synergistic bactericidal effect of carvacrol, cinnamaldehyde or thymol and refrigeration to inhibit *Bacillus cereus* in carrot broth. **Food Microbiology**, n. 23, p. 68-73, 2006.
- VITAS A, AGUADO V, GARCÍA-JALÓN I. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in fresh and processed foods in Navarra (Spain). **International Journal of Food Microbiology**, v.90, p.349-356, 2004
- VORST, K.L.; TODD, E.C.D.; RYSER, E.T. Transfer of *Listeria monocytogenes* during mechanical slicing of turkey breast, bologna and salami. **Journal of Food Protection**, v.69, n.3, p.619-626, 2006
- WEISS, J.; GIBIS, M.; SCHUH, V.; SALMINEN, H. Advances in ingredient and processing system for meat and meat products. **Meat Science**, v. 86, p. 196-213, 2010
- WILHELM, H.M.; SIERAKOWSKI, M.R.; SOUZA, G.P.; WYPYCH, F. Starch films reinforced with mineral clay. **Carbohydrate Polymers**, v.52, p.101-110, 2013.
- WINTER, C.H., BROCKMANN, S.O., SONNENTAG, S.R., SCHAUPP, T., PRAGER, R., BECKER, B. Prolonged hospital and community-based listeriosis outbreak caused by ready-to-eat scalded sausages. **Journal of Hospital Infection**, v.73, n.2, p.121-128, 2009.
- WONG, T.L., CAREY-SMITH, G.V., HOLLIS, L., HUDSON, J.A. Microbiological survey of prepackaged pate and ham in New Zealand. **Letters in Applied Microbiology**, v.41, p.106-111, 2005.

ZACTITI, E.M.; KIECKBUSCH, T. Potassium sorbate in biodegradable alginate films: effect of the antimicrobial agent concentration and crosslinking degree. **Journal of Food Engineering**, v.77, p.462-467, 2006.

ZHAO, T.; DOYLE, M. P.; ZHAO, P. Control of *Listeria monocytogenes* in a Biofilm by Competitive-Exclusion Microorganisms. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 7, p. 3996-4003, 2004.

7 ANEXO A

***Listeria monocytogenes* Scott A**

Tabela 29. Coeficientes da regressão para a variável resposta população de *L. monocytogenes* Scott A (log UFC/mL)

Fatores	Coeficientes	Erro padrão	t-valor	p-valor	Lim. de conf. 95%	de -	Lim. de conf. +95%
Média	2,46223	0,008650	284,648	0,000012	2,42501		2,49944
Eugenol(%) (L)	-2,12013	0,005297	-400,246	0,000006	-2,14292		-2,09734
Eugenol(%) (Q)	1,82191	0,006305	288,974	0,000012	1,79478		1,84904
Limoneno(%) (L)	-1,76195	0,005297	-332,628	0,000009	-1,78475		-1,73916
Limoneno(%) (Q)	1,38556	0,006305	219,763	0,000021	1,35843		1,41268
EugenolxLimonen	-2,10374	0,007491	-280,829	0,000013	-2,13598		-2,07151

Tabela 30. ANOVA para a variável resposta população de *L. monocytogenes* Scott A (log UFC/mL)

Fonte de variação	Soma de quadrados	Graus de liberdade	Quadrado Médio	F-calc	p-valor
Eugenol (%) (L)	35,9595	1	35,95953	160196,8	0,000006
Eugenol (%) (Q)	18,7446	1	18,74464	83505,9	0,000012
Limoneno(%) (L)	24,8358	1	24,83585	110641,7	0,000009
Limoneno(%) (Q)	10,8410	1	10,84102	48295,9	0,000021
EugenolxLimonen	17,7029	1	17,70294	78865,2	0,000013
Lack of Fit	4,9712	3	1,65706	7382,1	0,224135
Erro puro	0,0004	2	0,00022		
Total	106,6778	10			

$R^2=0,95$; $F_{0,95;5;5} = 5,05$; $F_{calc} = 20,55$

Figura 13. Valores experimentais versus valores previstos pelo modelo para a resposta população de *L. monocytogenes* Scott A (log UFC/mL)

***Listeria monocytogenes* Scott A**

Tabela 31. Valores experimentais, previstos pelo modelo, desvios e desvio relativo

Ensaio	Eugenol (%)	Limoneno (%)	População exp. (log UFC/mL)	População modelo (log UFC/mL)	Desvio (y-y') *	Desvio relativo ZI (%)
9 *	0,00625	0,025	2,5±0,15	2,4	0,09	3,9

* repetição do ensaio da condição 9 definido pelo planejamento experimental

**desvio=diferença entre os valores obtidos experimentalmente e os valores previstos pelo modelo

***Listeria monocytogenes* ATCC 35152**

Tabela 32. Coeficientes da regressão para a variável resposta população de *L. monocytogenes* ATCC 35152 (log UFC/mL)

Fatores	Coeficientes	Erro padrão	t-valor	p-valor	Lim. de conf. 95%	de -	Lim. de conf. +95%
Média	2,47221	0,004908	503,736	0,000004	2,45110		2,49333
Eugenol(%) (L)	-2,11717	0,003005	-704,463	0,000002	-2,13011		-2,10424
Eugenol(%) (Q)	1,81486	0,003577	507,355	0,000004	1,79947		1,83026
Limoneno(%) (L)	-1,76163	0,003005	-586,159	0,000003	-1,77456		-1,74869
Limoneno(%) (Q)	1,37308	0,003577	383,851	0,000007	1,35768		1,38847
EugenolxLimonen	-2,08188	0,004250	-489,826	0,000004	-2,10016		-2,06359

Tabela 33. ANOVA para a variável resposta população de *L. monocytogenes* ATCC 35152 (log UFC/mL)

Fonte de variação	Soma de quadrados	Graus de liberdade	Quadrado Médio	F-calc	p-valor
Eugenol (%) (L)	35,8594	1	35,85941	496268,4	0,000002
Eugenol (%) (Q)	18,5999	1	18,59991	257409,4	0,000004
Limoneno(%) (L)	24,8266	1	24,82661	343582,4	0,000003
Limoneno(%) (Q)	10,6466	1	10,64661	147341,4	0,000007
EugenolxLimonen	17,3368	1	17,33683	239929,3	0,000004
Lack of Fit	5,1450	3	1,71500	23734,4	0,245342
Erro puro	0,0001	2	0,00007		
Total	106,1225	10			

$R^2=0,95$; $F_{0,95;5;5} = 5,05$; $F_{calc} = 19,6$

Figura 14. Valores experimentais versus valores previstos pelo modelo para a resposta população de *L. monocytogenes* ATCC (log UFC/mL)

***Listeria monocytogenes* ATCC 35152**

Tabela 34. Valores experimentais, previstos pelo modelo, desvios e desvio relativo

Ensaio	Eugenol (%)	Limoneno (%)	População exp. (log UFC/mL)	População modelo (log UFC/mL)	Desvio (y-y') *	Desvio relativo ZI (%)
9 *	0,00625	0,025	2,5±0,15	2,4	0,08	3,5

* repetição do ensaio da condição 9 definido pelo planejamento experimental

**desvio=diferença entre os valores obtidos experimentalmente e os valores previstos pelo modelo

***Listeria monocytogenes* 1/2c**

Tabela 35. Coeficientes da regressão para a variável resposta população de *L. monocytogenes* 1/2c (log UFC/mL)

Fatores	Coeficientes	Erro padrão	t-valor	p-valor	Lim. de conf. 95%	de -	Lim. de conf. +95%
Média	3,41151	0,038923	87,6481	0,000130	3,24403		3,57898
Eugenol(%) (L)	-1,94335	0,023835	-81,5327	0,000150	-2,04591		-1,84080
Eugenol(%) (Q)	1,47227	0,028370	51,8961	0,000371	1,35021		1,59434
Limoneno(%) (L)	-1,58518	0,023835	-66,5056	0,000226	-1,68773		-1,48262
Limoneno(%) (Q)	1,03592	0,028370	36,5150	0,000749	0,91385		1,15798
EugenolxLimonen	-2,10374	0,033708	-62,4106	0,000257	-2,24878		-1,95871

Tabela 36. ANOVA para a variável resposta população de *L. monocytogenes* 1/2c (log UFC/mL)

Fonte de variação	Soma de quadrados	Graus de liberdade	Quadrado Médio	F-calc	p-valor
Eugenol (%) (L)	30,21291	1	30,21291	6647,585	0,000150
Eugenol (%) (Q)	12,24048	1	12,24048	2693,208	0,000371
Limoneno(%) (L)	20,10229	1	20,10229	4423,000	0,000226
Limoneno(%) (Q)	6,05997	1	6,05997	1333,344	0,000749
EugenolxLimonen	17,70294	1	17,70294	3895,085	0,000257
Lack of Fit	4,27259	3	1,42420	313,358	0,213183
Erro puro	0,00909	2	0,00454		
Total	86,78728	10			

$R^2=0,95$; $F_{0,95;5;5} = 5,05$; $F_{calc} = 19,17$

Figura 15. Valores experimentais versus valores previstos pelo modelo para a resposta população de *L. monocytogenes* 1/2c (log UFC/mL)

***Listeria monocytogenes* 1/2c**

Tabela 37. Valores experimentais, previstos pelo modelo, desvios e desvio relativo

Ensaio	Eugenol (%)	Limoneno (%)	População exp. (log UFC/mL)	População modelo (log UFC/mL)	Desvio (y-y') *	Desvio relativo ZI (%)
9 *	0,00625	0,025	3,5±0,1	3,4	0,14	4,0

* repetição do ensaio da condição 9 definido pelo planejamento experimental

**desvio=diferença entre os valores obtidos experimentalmente e os valores previstos pelo modelo

***Listeria monocytogenes* 1/2a**

Tabela 38. Coeficientes da regressão para a variável resposta população de *L. monocytogenes* 1/2a (log UFC/mL)

Fatores	Coeficientes	Erro padrão	t-valor	p-valor	Lim. de conf. 95%	de -	Lim. de conf. +95%
Média	3,44340	0,041044	83,8949	0,000142	3,26680		3,62000
Eugenol(%) (L)	-1,94168	0,025134	-77,2521	0,000168	-2,04983		-1,83354
Eugenol(%) (Q)	1,37990	0,029916	46,1260	0,000470	1,25118		1,50862
Limoneno(%) (L)	-1,57820	0,025134	-62,7907	0,000254	-1,68635		-1,47006
Limoneno(%) (Q)	1,00349	0,029916	33,5438	0,000888	0,87477		1,13221
EugenolxLimonen	-2,10206	0,035545	-59,1374	0,000286	-2,25500		-1,94912

Tabela 39. ANOVA para a variável resposta população de *L. monocytogenes* 1/2a (log UFC/mL)

Fonte de variação	Soma de quadrados	Graus de liberdade	Quadrado Médio	F-calc	p-valor
Eugenol (%) (L)	30,16108	1	30,16108	5967,888	0,000168
Eugenol (%) (Q)	10,75271	1	10,75271	2127,609	0,000470
Limoneno(%) (L)	19,92584	1	19,92584	3942,669	0,000254
Limoneno(%) (Q)	5,68657	1	5,68657	1125,185	0,000888
EugenolxLimonen	17,67462	1	17,67462	3497,229	0,000286
Lack of Fit	4,09782	3	1,36594	270,275	0,263689
Erro puro	0,01011	2	0,00505		
Total	84,83015	10			

$R^2=0,95$; $F_{0,95;5;5} = 5,05$; $F_{calc} = 19,69$

Figura 16. Valores experimentais versus valores previstos pelo modelo para a resposta população de *L. monocytogenes* 1/2a (log UFC/mL)

***Listeria monocytogenes* 1/2a**

Tabela 40. Valores experimentais, previstos pelo modelo, desvios e desvio relativo

Ensaio	Eugenol (%)	Limoneno (%)	População exp. (log UFC/mL)	População modelo (log UFC/mL)	Desvio (y-y') *	Desvio relativo ZI (%)
9 *	0,00625	0,025	3,4±0,1	3,4	0,01	0,32

* repetição do ensaio da condição 9 definido pelo planejamento experimental

**desvio=diferença entre os valores obtidos experimentalmente e os valores previstos pelo modelo

***Listeria monocytogenes* 4b**

Tabela 41. Coeficientes da regressão para a variável resposta população de *L. monocytogenes* 4b (log UFC/mL)

Fatores	Coeficientes	Erro padrão	t-valor	p-valor	Lim. de conf. 95%	de -	Lim. de conf. +95%
Média	3,42777	0,063883	53,6569	0,000347	3,15290		3,70263
Eugenol(%) (L)	-1,93929	0,039120	-49,5725	0,000407	-2,10761		-1,77097
Eugenol(%) (Q)	1,36963	0,046562	29,4150	0,001154	1,16929		1,56997
Limoneno(%) (L)	-1,62086	0,039120	-41,4329	0,000582	-1,78918		-1,45254
Limoneno(%) (Q)	1,04794	0,046562	22,5061	0,001968	0,84759		1,24828
EugenolxLimonen	-2,06969	0,055324	-37,4101	0,000714	-2,30773		-1,83165

Tabela 42. ANOVA para a variável resposta população de *L. monocytogenes* 4b (log UFC/mL)

Fonte de variação	Soma de quadrados	Graus de liberdade	Quadrado Médio	F-calc	p-valor
Eugenol (%) (L)	30,08667	1	30,08667	2457,435	0,000407
Eugenol (%) (Q)	10,59329	1	10,59329	865,244	0,001154
Limoneno(%) (L)	21,01757	1	21,01757	1716,685	0,000582
Limoneno(%) (Q)	6,20143	1	6,20143	506,523	0,001968
EugenolxLimonen	17,13444	1	17,13444	1399,516	0,000714
Lack of Fit	4,76267	3	1,58756	129,669	0,227663
Erro puro	0,02449	2	0,01224		
Total	86,19174	10			

$R^2=0,94$; $F_{0,95;5;5} = 5,05$; $F_{calc} = 17,14$

Figura 17. Valores experimentais versus valores previstos pelo modelo para a resposta população de *L. monocytogenes* 4b (log UFC/mL)

***Listeria monocytogenes* 4b**

Tabela 43. Valores experimentais, previstos pelo modelo, desvios e desvio relativo

Ensaio	Eugenol (%)	Limoneno (%)	População exp. (log UFC/mL)	População modelo (log UFC/mL)	Desvio (y-y') *	Desvio relativo ZI (%)
9 *	0,00625	0,025	3,4±0,1	3,5	0,13	3,8

* repetição do ensaio da condição 9 definido pelo planejamento experimental

**desvio=diferença entre os valores obtidos experimentalmente e os valores previstos pelo modelo

***Listeria monocytogenes* f**

Tabela 44. Coeficientes da regressão para a variável resposta população de *L. monocytogenes* f (log UFC/mL)

Fatores	Coeficientes	Erro padrão	t-valor	p-valor	Lim. de conf. 95%	de -	Lim. de conf. +95%
Média	3,35482	0,053789	62,3696	0,000257	3,12338		3,58626
Eugenol(%) (L)	-1,93823	0,032939	-58,8428	0,000289	-2,07996		-1,79650
Eugenol(%) (Q)	1,46237	0,039205	37,3003	0,000718	1,29368		1,63106
Limoneno(%) (L)	-1,57529	0,032939	-47,8244	0,000437	-1,71702		-1,43357
Limoneno(%) (Q)	1,07473	0,039205	27,4129	0,001328	0,90605		1,24342
EugenolxLimonen	-2,05271	0,046583	-44,0658	0,000515	-2,25314		-1,85228

Tabela 45. ANOVA para a variável resposta população de *L. monocytogenes* f (log UFC/mL)

Fonte de variação	Soma de quadrados	Graus de liberdade	Quadrado Médio	F-calc	p-valor
Eugenol (%) (L)	30,05389	1	30,05389	3462,479	0,000289
Eugenol (%) (Q)	12,07640	1	12,07640	1391,310	0,000718
Limoneno(%) (L)	19,85238	1	19,85238	2287,173	0,000437
Limoneno(%) (Q)	6,52265	1	6,52265	751,468	0,001328
EugenolxLimonen	16,85453	1	16,85453	1941,793	0,000515
Lack of Fit	3,92621	3	1,30874	150,778	0,186596
Erro puro	0,01736	2	0,00868		
Total	85,34957	10			

$R^2=0,95$; $F_{0,95;5;5} = 5,05$; $F_{calc} = 20,87$

Figura 18. Valores experimentais versus valores previstos pelo modelo para a resposta população de *L. monocytogenes* f (log UFC/mL)

Listeria monocytogenes f

Tabela 46. Valores experimentais, previstos pelo modelo, desvios e desvio relativo

Ensaio	Eugenol (%)	Limoneno (%)	População exp. (log UFC/mL)	População modelo (log UFC/mL)	Desvio (y-y') *	Desvio relativo ZI (%)
9 *	0,00625	0,025	3,4±0,1	3,3	0,1	2,9

* repetição do ensaio da condição 9 definido pelo planejamento experimental

**desvio=diferença entre os valores obtidos experimentalmente e os valores previstos pelo modelo

Pseudomonas fluorescens

Tabela 47. Coeficientes da regressão para a variável resposta população de *Pseudomonas fluorescens* (log UFC/mL)

Fatores	Coeficientes	Erro padrão	t-valor	p-valor	Lim. de conf. 95%	de - Lim. de conf. +95%
Média	3.33333	0.088192	37.7964	0.000699	2.95388	3.71279
Eugenol(%) (L)	-2.10156	0.054006	-38.9134	0.000660	-2.33393	-1.86919
Eugenol(%) (Q)	1.62083	0.064280	25.2151	0.001569	1.34426	1.89741
Limoneno(%) (L)	-1.52123	0.054006	-28.1677	0.001258	-1.75360	-1.28886
Limoneno(%) (Q)	1.02083	0.064280	15.8810	0.003942	0.74426	1.29741
EugenolxLimonen	-2.20000	0.076376	-28.8048	0.001203	-2.52862	-1.87138

Tabela 48. ANOVA para a variável resposta população de *Pseudomonas fluorescens* (log UFC/mL)

Fonte de variação	Soma de quadrados	Graus de liberdade	Quadrado Médio	F-calc	p-valor
Eugenol (%) (L)	35.33247	1	35.33247	1514.248	0.000659
Eugenol (%) (Q)	14.83539	1	14.83539	635.8025	0.00156
Limoneno(%) (L)	18.51315	1	18.51315	793.4207	0.00125
Limoneno(%) (Q)	5.884803	1	5.884803	252.2058	0.00394
EugenolxLimonen	19.36	1	19.36	829.7142	0.00120
Lack of Fit	12.40937	3	4.136458	177.2767	0.11561
Erro puro	0.046666	2	0.023333		
Total	102.3272	10			

$R^2=0,89$; $F_{0,95;5;5} = 5,05$; $F_{calc} = 7,25$

Figura 19. Valores experimentais versus valores previstos pelo modelo para a resposta população de *Pseudomonas fluorescens* (log UFC/mL)

Pseudomonas fluorescens

Tabela 49. Valores experimentais, previstos pelo modelo, desvios e desvio relativo

Ensaio	Eugenol (%)	Limoneno (%)	População exp. (log UFC/mL)	População modelo (log UFC/mL)	Desvio (y-y') *	Desvio relativo ZI (%)
9 *	0,10	0,20	3,4±0,2	2,9	0,48	14,2

* repetição do ensaio da condição 9 definido pelo planejamento experimental

**desvio=diferença entre os valores obtidos experimentalmente e os valores previstos pelo modelo

Pseudomonas putida

Tabela 50. Coeficientes da regressão para a variável resposta população de *Pseudomonas putida* (log UFC/mL)

Fatores	Coeficientes	Erro padrão	t-valor	p-valor	Lim. de conf. 95%	de -	Lim. de conf. +95%
Média	3.10000	0.057735	53.6936	0.000347	2.85159		3.34841
Eugenol(%) (L)	-2.05674	0.035355	-58.1734	0.000295	-2.20886		-1.90462
Eugenol(%) (Q)	1.81250	0.042081	43.0714	0.000539	1.63144		1.99356
Limoneno(%) (L)	-1.61480	0.035355	-45.6734	0.000479	-1.76692		-1.46268
Limoneno(%) (Q)	1.03750	0.042081	24.6547	0.001641	0.85644		1.21856
EugenolxLimonen	-2.22500	0.050000	-44.5000	0.000505	-2.44013		-2.00987

Tabela 51. ANOVA para a variável resposta população de *Pseudomonas putida* (log UFC/mL)

Fonte de variação	Soma de quadrados	Graus de liberdade	Quadrado Médio	F-calc	p-valor
Eugenol (%) (L)	33.84139	1	33.84139	3384.139	0.000295
Eugenol (%) (Q)	18.55147	1	18.55147	1855.147	0.000538
Limoneno(%) (L)	20.86055	1	20.86055	2086.055	0.000479
Limoneno(%) (Q)	6.078529	1	6.078529	607.852	0.001641
EugenolxLimonen	19.8025	1	19.8025	1980.25	0.000504
Lack of Fit	9.313046	3	3.104348	310.434	0.113212
Erro puro	0.02	2	0.01		
Total	103.9618	10			

$R^2=0,91$; $F_{0,95;5;5} = 5,05$; $F_{calc} = 10,12$

Figura 20. Valores experimentais versus valores previstos pelo modelo para a resposta população de *Pseudomonas putida* (log UFC/mL)

Pseudomonas putida

Tabela 52. Valores experimentais, previstos pelo modelo, desvios e desvio relativo

Ensaio	Eugenol (%)	Limoneno (%)	População exp. (log UFC/mL)	População modelo (log UFC/mL)	Desvio (y-y') *	Desvio relativo ZI (%)
9 *	0,1	0,2	3,4±0,1	3,0	0,43	14,3

* repetição do ensaio da condição 9 definido pelo planejamento experimental

**desvio=diferença entre os valores obtidos experimentalmente e os valores previstos pelo modelo

Pseudomonas aeruginosa

Tabela 53. Coeficientes da regressão para a variável resposta população de *Pseudomonas aeruginosa* (log UFC/mL)

Fatores	Coeficientes	Erro padrão	t-valor	p-valor	Lim. de conf. 95%	de -	Lim. de conf. +95%
Média	3.03333	0.066667	45.5000	0.000483	2.74649		3.32018
Eugenol(%) (L)	-2.02656	0.040825	-49.6404	0.000406	-2.20222		-1.85091
Eugenol(%) (Q)	1.72083	0.048591	35.4145	0.000796	1.51176		1.92990
Limoneno(%) (L)	-1.49623	0.040825	-36.6500	0.000744	-1.67189		-1.32058
Limoneno(%) (Q)	0.97083	0.048591	19.9796	0.002496	0.76176		1.17990
EugenolxLimonen	-2.15000	0.057735	-37.2391	0.000720	-2.39841		-1.90159

Tabela 54. ANOVA para a variável resposta população de *Pseudomonas aeruginosa* (log UFC/mL)

Fonte de variação	Soma de quadrados	Graus de liberdade	Quadrado Médio	F-calc	p-valor
Eugenol (%) (L)	32.85560	1	32.8556006	2464.170	0.000405
Eugenol (%) (Q)	16.72245	1	16.722451	1254.183	0.000796
Limoneno(%) (L)	17.90965	1	17.9096591	1343.224	0.000743
Limoneno(%) (Q)	5.322450	1	5.32245098	399.1838	0.002495
EugenolxLimonen	18.49	1	18.49	1386.75	0.000720
Lack of Fit	11.78974	3	3.92991343	294.7435	0.113383
Erro puro	0.026666	2	0.0133333333		
Total	99.1290	10			

$R^2 = 0,88$; $F_{0,95;5;5} = 5,05$; $F_{calc} = 7,40$

Figura 21. Valores experimentais versus valores previstos pelo modelo para a resposta população de *Pseudomonas aeruginosa* (log UFC/mL)

Pseudomonas aeruginosa

Tabela 55. Valores experimentais, previstos pelo modelo, desvios e desvio relativo

Ensaio	Eugenol (%)	Limoneno (%)	População exp. (log UFC/mL)	População modelo (log UFC/mL)	Desvio (y-y') *	Desvio relativo ZI (%)
9 *	0,1	0,2	3,0±0,1	2,5	0,46	15,2

* repetição do ensaio da condição 9 definido pelo planejamento experimental

**desvio=diferença entre os valores obtidos experimentalmente e os valores previstos pelo modelo

Salmonella Give**Tabela 56.** Coeficientes da regressão para a variável resposta população de *Salmonella Give* (log UFC/mL)

Fatores	Coeficientes	Erro padrão	t-valor	p-valor	Lim. de conf. 95%	de -	Lim. de conf. +95%
Média	6.266667	0.066667	94.0000	0.000113	5.97982		6.553510
Eugenol(%) (L)	-0.923008	0.040825	-22.6090	0.001951	-1.09866		-0.747353
Eugenol(%) (Q)	0.879167	0.048591	18.0931	0.003041	0.67010		1.088238
Limoneno(%) (L)	-0.912652	0.040825	-22.3553	0.001995	-1.08831		-0.736997
Limoneno(%) (Q)	0.879167	0.048591	18.0931	0.003041	0.67010		1.088238
EugenolxLimonen	-0.650000	0.057735	-11.2583	0.007797	-0.89841		-0.401586

Tabela 57. ANOVA para a variável resposta população de *Salmonella Give* (log UFC/mL)

Fonte de variação	Soma de quadrados	Graus de liberdade	Quadrado Médio	F-calc	p-valor
Eugenol (%) (L)	6.81555	1	6.815547	511.1660	0.001951
Eugenol (%) (Q)	4.36480	1	4.364804	327.3603	0.003041
Limoneno(%) (L)	6.66348	1	6.663475	499.7607	0.001995
Limoneno(%) (Q)	4.36480	1	4.364804	327.3603	0.003041
EugenolxLimonen	1.69000	1	1.690000	126.7500	0.007797
Lack of Fit	1.46598	3	0.488659	36.6495	0.026678
Erro puro	0.02667	2	0.013333		
Total	23.40727	10			

$R^2 = 0,93$; $F_{0,95;5;5} = 5,05$; $F_{calc} = 8,40$

***Salmonella* Enteritidis**

Tabela 58. Coeficientes da regressão para a variável resposta população de *Salmonella Enteritidis* (log UFC/mL)

Fatores	Coeficientes	Erro padrão	t-valor	p-valor	Lim. de conf. 95%	de -	Lim. de conf. +95%
Média	6.200000	0.057735	107.3872	0.000087	5.95159		6.448414
Eugenol(%) (L)	-0.837652	0.035355	-23.6924	0.001777	-0.98977		-0.685531
Eugenol(%) (Q)	0.981250	0.042081	23.3180	0.001834	0.80019		1.162311
Limoneno(%) (L)	-0.855330	0.035355	-24.1924	0.001704	-1.00745		-0.703208
Limoneno(%) (Q)	0.906250	0.042081	21.5357	0.002149	0.72519		1.087311
EugenolxLimonen	-0.600000	0.050000	-12.0000	0.006873	-0.81513		-0.384867

Tabela 59. ANOVA para a variável resposta população de *Salmonella Enteritidis* (log UFC/mL)

Fonte de variação	Soma de quadrados	Graus de liberdade	Quadrado Médio	F-calc	p-valor
Eugenol (%) (L)	5.61329	1	5.613293	561.3293	0.001777
Eugenol (%) (Q)	5.43728	1	5.437279	543.7279	0.001834
Limoneno(%) (L)	5.85272	1	5.852716	585.2716	0.001704
Limoneno(%) (Q)	4.63787	1	4.637868	463.7868	0.002149
EugenolxLimonen	1.44000	1	1.440000	144.0000	0.006873
Lack of Fit	1.98024	3	0.660080	66.0080	0.014961
Erro puro	0.02000	2	0.010000		
Total	22.70182	10			

$R^2 = 0,91$; $F_{0,95;5;5} = 5,05$; $F_{calc} = 9,20$

8 ANEXO B

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – TCLE

1. Informações do Participante da Pesquisa

Nome:		
Documento de Identidade (tipo):	Nº.:	Sexo: () M () F
Local de Nascimento:	Data de Nascimento: / /	
Endereço:	Nº.:	
Complementos:	Bairro:	
Cidade:	Estado:	
CEP:	Telefones:	

2. Informações do Responsável Legal

Nome:		
Documento de Identidade (tipo):	Nº.:	Sexo: () M () F
Local de Nascimento:	Data de Nascimento: / /	
Endereço:	Nº.:	
Complementos:	Bairro:	
Cidade:	Estado:	
CEP:	Telefones:	

3. Título do Projeto de Pesquisa

Avaliação do uso de filmes biodegradáveis à base de alginato incorporado de antimicrobianos naturais no controle de <i>L. monocytogenes</i> em embutido cárneo fatiado
--

4. Duração da Pesquisa

1 semana para avaliações sensoriais

5. Nome do Pesquisador Responsável

Mariza Landgraf	
Cargo/ Função: Prof. Associada	Nº de registro do Conselho Regional: CRF nº6303

6. Instituição/Instituições

Universidade de São Paulo Faculdade de Ciências Farmacêuticas Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental Av. Prof. Lineu Prestes, 580, bloco 13B, CEP 05508-000 São Paulo/SP Telefone: 11-3091-2496
--

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – TCLE

Sou pesquisadora do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo e estou realizando uma pesquisa que avaliará o sabor de salame cortado em fatias, com cada uma delas coberta com um filme que foi produzido com alginato (substância retirada de algas marinhas) (filme biodegradável) adicionado de substâncias naturais (eugenol e limoneno). Esse filme é utilizado como embalagem primária, isto é, separando as fatias de salame com a finalidade de controlar a população de micro-organismos nesse alimento. Para que possa ser utilizada de maneira adequada, é necessário que a quantidade dessa substância a ser empregada não interfira no sabor e aroma do salame.

A utilização desses filmes como embalagens primárias ou secundárias é uma alternativa ecologicamente correta na área de embalagens para alimentos. Esta pesquisa tem como objetivo avaliar o potencial de utilização de filmes à base de alginato, com adição de substâncias naturais – eugenol (retirado do cravo) e limoneno (retirado do limão) – que eliminam micro-organismos.

Ao participar da pesquisa, você receberá 3 amostras de salame fatiado adquiridos no comércio da cidade de São Paulo. As amostras estarão codificadas com números de três dígitos, sendo uma amostra-controle e duas amostras na qual foi utilizada a cobertura de filme separando as fatias de salame que será retirada antes de o salame ser servido à você. Por favor, indique o quanto você gostou ou desgostou deste produto através de uma escala de 9 pontos, onde 1 na escala representa “desgostei extremamente” e 9 representa “gostei extremamente”. Haverá espaço para você escrever sua opinião sobre o produto. Após experimentar uma amostra, você deverá comer um biscoito de água e sal e beber um pouco de água para que não haja interferência de sabor entre uma amostra e outra.

Ao participar desta pesquisa, você contribuirá para o emprego futuro de embalagens biodegradáveis incorporadas de substâncias naturais, o que acarretará na redução da utilização de recursos não-renováveis como material de embalagem.

Para participar desta análise você deverá ter entre 18 e 60 anos, ser consumidor regular de salame, não possuir histórico de manifestação de alergia, intolerância ou outro tipo de restrição (como doença crônica ou tratamento médico com uso de medicamentos que podem interagir) em relação aos ingredientes do alimento; não deve estar gripado, resfriado ou indisposto ou ter entrado em contato com materiais, alimentos ou cosméticos de cheiro forte. Caso atenda a essas condições você poderá participar desta pesquisa.

Os dados serão mantidos em sigilo e você terá total liberdade para desistir da pesquisa a qualquer momento.

Os riscos e possíveis desconfortos são mínimos para o sujeito da pesquisa uma vez que o alimento a ser ingerido é amplamente consumido pela população brasileira e cuja produção é feita com as boas práticas de produção de alimento. Em caso de possíveis problemas alérgicos a algum dos componentes da formulação, estaremos à disposição para o devido amparo, utilizando para assistência médica o Hospital Universitário do campus da capital, cujo encaminhamento se procederá através da pesquisadora responsável pelo projeto (orientadora).

A participação é voluntária e o sujeito da pesquisa terá o direito de desistir a qualquer momento, assegurando-lhes a inteira liberdade de participar ou não da pesquisa, sem quaisquer represálias. O sujeito da pesquisa será identificado por um número e todas e quaisquer opiniões e dados pessoais serão mantidos em sigilo. Em caso de dúvidas ou quaisquer outros problemas, o sujeito da pesquisa poderá interromper a qualquer momento sua participação.

Dessa forma, o(a) convidado(a) a participar de nossa pesquisa e caso desejar, por gentileza, assine este documento.

Observações complementares

Disponibilizamos para responder quaisquer dúvidas quanto às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa através dos contatos:

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – TCLE

Prof. Associada Mariza Landgraf (Orientador)
Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental
Laboratório de Microbiologia de Alimentos
Av. Prof. Lineu Prestes, 580, bloco 13B
Telefone: (11) 3091-2496

Maria Crystina Igarashi (Aluna de Doutorado)
Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental
Laboratório de Microbiologia de Alimentos
Av. Prof. Lineu Prestes, 580, bloco 13B
Telefone: (11) 3091-2493

Consentimento Pós-Esclarecido

Declaro que, após ter sido convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa.

São Paulo, _____ de _____ de _____.

Assinatura do Participante de Pesquisa
ou do Responsável Legal

Assinatura do Pesquisador Responsável

Para qualquer questão, dúvida, esclarecimento ou reclamação sobre aspectos éticos relativos a este protocolo de pesquisa, favor entrar em contato com o **Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo**: Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bloco 13 A, Butantã, São Paulo, CEP 05508-000, Telefones 3091-3622 e 3091-3677, e-mail: cepfcf@usp.br.

ANÁLISE SENSORIAL DE SALAME

Sexo: ☐ Feminino
☐ Masculino

Idade: _____ anos

Você está recebendo TRÊS amostras de salame tipo Italiano. Por favor, assinale nas escalas abaixo a sua opinião em relação:

SABOR E AROMA

-
- ☐ Gostei extremamente
 - ☐ Gostei muito
 - ☐ Gostei regularmente
 - ☐ Gostei ligeiramente
 - ☐ Indiferente
 - ☐ Desgostei ligeiramente
 - ☐ Desgostei regularmente
 - ☐ Desgostei muito
 - ☐ Desgostei extremamente

-
- ☐ Gostei extremamente
 - ☐ Gostei muito
 - ☐ Gostei regularmente
 - ☐ Gostei ligeiramente
 - ☐ Indiferente
 - ☐ Desgostei ligeiramente
 - ☐ Desgostei regularmente
 - ☐ Desgostei muito
 - ☐ Desgostei extremamente

-
- ☐ Gostei extremamente
 - ☐ Gostei muito
 - ☐ Gostei regularmente
 - ☐ Gostei ligeiramente
 - ☐ Indiferente
 - ☐ Desgostei ligeiramente
 - ☐ Desgostei regularmente
 - ☐ Desgostei muito
 - ☐ Desgostei extremamente

APARÊNCIA

-
- ☐ Gostei extremamente
 - ☐ Gostei muito
 - ☐ Gostei regularmente
 - ☐ Gostei ligeiramente
 - ☐ Indiferente
 - ☐ Desgostei ligeiramente
 - ☐ Desgostei regularmente
 - ☐ Desgostei muito
 - ☐ Desgostei extremament

-
- ☐ Gostei extremamente
 - ☐ Gostei muito
 - ☐ Gostei regularmente
 - ☐ Gostei ligeiramente
 - ☐ Indiferente
 - ☐ Desgostei ligeiramente
 - ☐ Desgostei regularmente
 - ☐ Desgostei muito
 - ☐ Desgostei extremamente

-
- ☐ Gostei extremamente
 - ☐ Gostei muito
 - ☐ Gostei regularmente
 - ☐ Gostei ligeiramente
 - ☐ Indiferente
 - ☐ Desgostei ligeiramente
 - ☐ Desgostei regularmente
 - ☐ Desgostei muito
 - ☐ Desgostei extremamente

Comentários:

9 ANEXO C

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Secretaria de Pós-Graduação

Informações para os Membros de Bancas Julgadoras de Mestrado/Doutorado

1. O candidato fará uma apresentação oral do seu trabalho, com duração máxima de trinta minutos.

2. Os membros da banca farão a arguição oral. Cada examinador disporá, no máximo, de trinta minutos para arguir o candidato, exclusivamente sobre o tema do trabalho apresentado, e o candidato disporá de trinta minutos para sua resposta.

2.1 Com a devida anuência das partes (examinador e candidato), é facultada a arguição na forma de diálogo em até sessenta minutos por examinador.

3. A sessão de defesa será aberta ao público.

4. Terminada a arguição por todos os membros da banca, a mesma se reunirá reservadamente e expressará na ata (relatório de defesa) a aprovação ou reprovação do candidato, baseando-se no trabalho escrito e na arguição.

4.1 Caso algum membro da banca reprove o candidato, a Comissão Julgadora deverá emitir um parecer a ser escrito em campo exclusivamente indicado na ata.

4.2 Será considerado aprovado o aluno que obtiver aprovação por unanimidade ou pela maioria da banca.

5. Dúvidas poderão ser esclarecidas junto à Secretaria de Pós-Graduação: pgfarma@usp.br, (11) 3091 3621.

São Paulo, 23 de maio de 2014.

Prof. Dr. Adalberto Pessoa Junior
Presidente da CPG/FCF/USP